



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TITULO**

**Flavonoides, propiedades  
y obtención de nitroderivados**

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICO

PRESENTA:

FELIPE MUÑOZ GONZÁLEZ

**REVISIÓN MONOGRÁFICA**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Presidente:** Manuel Jiménez Estrada

**Vocal:** José Manuel Méndez Stivalet

**Secretario:** Ana Adela Sánchez Mendoza

**1er suplente:** Blas Flores Pérez

**2do suplente:** Daniel Méndez Iturbide

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

LABORATORIO 2-10

ÁREA DE PRODUCTOS NATURALES

INSTITUTO DE QUÍMICA

Dr. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

**Asesor del tema:** Manuel Jiménez Estrada \_\_\_\_\_

**Sustentante:** Felipe Muñoz González \_\_\_\_\_

**AGRADECIMIENTOS:**

*A Dios por lo que entiendo y también por lo mucho que no, gracias.*

*También gracias por haber puesto en mi camino a mi madre, un ser de luz que siempre está dispuesta a dar todo sin pedir nada a cambio.*

*Gracias a mi hermano por ser un ejemplo de fe, esfuerzo y dedicación.*

*A mi padre por siempre estar cuando se le necesita.*

*Por supuesto que le agradezco al Dr. Manuel Jiménez Estrada por su enorme paciencia y por todo su apoyo recibido, ya que sin su ayuda esta Tesis no se hubiera realizado.*

*A mi prima Noemí muchas gracias por haber colaborado al facilitarme artículos para esta investigación.*

**ÍNDICE**

OBJETIVOS	pág.10
RESUMEN	pág.11
<b>1. PROPIEDADES GENERALES Y FUNCIÓN NATURAL</b>	pág.12
1.1 Estructura	pág.14
1.2 Distribución natural	pág.17
1.3 Flavonoides, su importancia nutricional	pág.18
1.4 Función natural	pág.20
1.4.1 Resistencia a las enfermedades	pág.20
1.4.2 Reguladores del crecimiento en plantas	pág. 21
1.4.3 Pigmento de flores	pág. 22
1.5 Biogénesis	pág.23
1.6 Enzimas de la ruta biosintética de los flavonoides.	pág. 24
<b>2. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LOS FLAVONOIDES</b>	pág. 26
<b>2.1 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES</b>	pág.28
2.1.1 Deslocalización de Radicales	pág.31
2.1.2 Relación estructura actividad antioxidante	pág. 33
2.1.2.1 Criterios estructurales en inhibición de peroxidación lipídica	pág.33
2.1.3 Actividad quelatante	pág.38
<b>2.2. PROPIEDADES CARDIOTÓNICAS</b>	pág.39
2.2.1 Modulación de la producción de óxido nítrico (NO)	pág.40

2.2.1.1 Vasorelajación por modulación de NO	pág.41
2.2.1.2 Quercetina y su acción promotora de eNOS	pág.42
2.2.1.3 Kaempferol disminuye expresión de iNOS	pág.43
2.2.1.4 NO como fuente de especies reactivas de nitrógeno (ERN)	pág.44
2.2.2 Flavonoides inhiben oxidación de LDL	pág.45
2.2.3 Disminución de placas de colesterol y aterosclerosis	pág.47
2.2.4 Protección de vino tinto contra oxidación de LDL	pág.48
2.2.5 Propiedades antitrombóticas	pág.49
2.2.6 Actividad vasodilatadora	pág.50
2.2.7 Efectos sobre presión sanguínea	pág.50
2.2.8 Paradoja Francesa	pág.50
2.2.9 Paraoxonasa, demencia vascular y Alzheimer	pág.52
<b>2.3 PROPIEDADES ANTICANCEROSAS</b>	pág.53
2.3.1 Actividad antioxidante y carcinogénesis	pág.55
2.3.1.1 Mecanismo Prooxidante	pág.56
2.3.2 Regulación de apoptosis	pág.57
2.3.3 Regularización del ciclo celular	pág.58
2.3.4 Inhibición de angiogénesis	pág.59
2.3.5 Regulación de las rutas celulares de transducción de señales	pág.59
2.3.5.1 Regulación de NF-kB	pág.59
2.3.5.2 Regulación de Proteína C reactiva, COX-2, iNOS e inflamación	pág.61
2.3.6 La alimentación como factor preventivo de cáncer	pág.62

2.3.7 Compuestos anticancerígenos de uso comercial	pág.63
2.3.7.1 Fenoxodiol	pág.63
2.3.7.2 Flavopiridol	pág.64
2.3.7.3 Xantohumol	pág.65
<b>2.4. EFECTOS ANTIMICROBIANOS DE LOS FLAVONOIDES</b>	pág.66
2.4.1 Actividad antibacterial	pág.67
2.4.1.1 Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	pág.68
2.4.2 Estudio de actividad antiparasitaria	pág.69
2.4.2.1 Flavonoides contra <i>Plasmodium</i>	pág.69
2.4.2.2 Flavonoides contra <i>Leishmania</i>	pág.71
2.4.2.3 Flavonoides contra <i>Tripanozoma</i>	pág.72
2.4.3 Actividad antifúngica	pág.73
2.4.4 Actividad antiviral	pág.74
<b>3. CASOS PARTICULARES</b>	pág.76
3.1 Naringenina	pág.76
3.1.1 Estudios anticancerígenos	pág.77
3.1.2 Inhibición de ingesta de glucosa en células tumorales	pág.78
3.1.3 Efecto antiaterogénico por inhibición de la enzima ACAT	pág.78
3.1.4 Naringenina mejora dislipidemia	pág.80
3.1.5 Naringenina inhibe virus de hepatitis C (HCV)	pág.81
3.2 Quercetina	pág.81
3.2.1 Actividad Antioxidante	pág.82

---

3.2.2 Actividad cardiovascular	pág.84
3.2.3 Diabetes	pág.85
3.2.4 Actividad antiinflamatoria	pág.85
3.2.5 Actividad antitumoral	pág.85
3.2.6 Regulación de la proteína mutante p53	pág.86
3.3 Ipriflavona	pág.87
3.4 Diosmina	pág.88
3.5 Dosmalfato	pág.89
3.6 Icarisid II	pág.90
<b>4. COMPUESTOS NITRADOS DE USO FARMACOLÓGICO</b>	pág.91
4.1 Nitroprusiato	pág.91
4.2 Nitroflurbiprofeno	pág.92
4.3 Nitroaspirina	pág.92
4.4 Estudios comparativos entre fármacos y sus derivados nitrados	pág.93
4.5 Nitroflavonas	pág.96
<b>5. REACCIONES DE NITRACIÓN EN FLAVONOIDES</b>	pág.99
5.1 Nitración “suave” de naringenina utilizando la mezcla de gases NO <sub>x</sub>	pág.101
5.2 Nitración utilizando nitratos de metales de transición	pág.102
5.3 Nitro y amino-derivados con actividad citotóxica	pág.103
<b>6. CONCLUSIONES</b>	pág.104
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	pág.107

---



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig.1.** Estructura básica y sistema de numeración. Flavona; (2-fenil-cromano: IUPAC).
- Fig.2.** Nombres triviales y nomenclatura IUPAC de las principales familias de flavonoides.
- Fig.3.** Ruta biosintética de los flavonoides
- Fig.4.** Deslocalización de radical libre en el anillo de catecol.
- Fig.5.** Protección contra peroxidación lipídica por varios polifenoles.
- Fig.6.** Protección contra peroxidación lipídica de varios flavonoides.
- Fig.7.** Protección contra la peroxidación de varios flavonoides con –OH en 3
- Fig.8.** Protección de la peroxidación lipídica de derivados de galangina.
- Fig.9.** Aumento proporcional del nivel de fosforilación de eNOS en función de la concentración de quercetina.
- Fig.10.** Expresión de la isoforma inducible iNOS de manera inversa a la concentración de kaempferol.
- Fig.11.** Kaempferol.
- Fig.12.** Principales mecanismos de acción inhibitoria de la peroxidación lipídica debido a flavonoides.
- Fig.13.** Disminución de aterosclerosis por consumo de vino.
- Fig.14.** Fenoxodiol
- Fig.15.** Flavopiridol (Alvocidib)
- Fig.16.** Xantohumol
- Fig.17.** Naringenina
- Fig.18.** Quercetina
- Fig.19.** Ipriflavona
- Fig.20.** Diosmina
- Fig.21.** Dosmalfato
- Fig.22.** Icarisid II
- Fig.23.** Nitroaspirina
- Fig.24.** Nitroflavonas con propiedades ansiolíticas.
- Fig.25.** Antimicrobiano con estructura de metronidazol e isoflavona.
- Fig.26.** Nitración no selectiva de miricetina
- Fig.27.** Generación *in situ* de gases NO<sub>x</sub>
- Fig.28.** 3'-nitronaringenina
- Fig.29.** 7-acetil-3'-nitronaringenina
- Fig.30.** Flavona aislada de *Gardenia obtusifolia*.

---

## ÍNDICE DE DE TABLAS

**Tabla 1.** Principales familias de flavonoides, compuesto y fuente de obtención.

**Tabla 2.** Numero de citas publicadas en el portal PubMed.

**Tabla 3.** Capacidad antioxidante de Catequinas de Té y potenciales de reducción.

**Tabla 4.** Comparación de la capacidad antioxidante de diferentes flavonoides y vitamina E.

**Tabla 5.** Comparación de la capacidad antioxidante de flavonoides hidrosolubles y vitamina C.

**Tabla 6.** Acción anticancerígena *in vitro* de diferentes flavonoides.

**Tabla 7.** Estructura y actividad de flavonoides antiparasitarios.

**Tabla 8.** Farmacología de nitroderivados.

**Tabla 9.** Actividad farmacodinámica de nitroderivados

**Tabla 10.** Actividad inhibitoria de la COX de nitroderivados.

**Tabla 11.** Actividad antiproliferativa de diferentes flavonoides de origen natural y sus derivados sintéticos.

## OBJETIVOS

- Hacer una revisión bibliográfica de las propiedades farmacológicas más relevantes de la familia de los flavonoides, así como los avances reportados en los últimos 5 años concernientes a su aplicación a la terapéutica médica.
- Hacer una revisión de algunos nitro-flavonoides y de sus métodos de obtención.

## RESUMEN

Del término en latín *flavus*, que significa amarillo, los flavonoides integran la familia más grande del grupo de compuestos polifenólicos de origen natural, se encuentran distribuidos por prácticamente todo el reino vegetal. Fueron descubiertos en 1930, desde ese tiempo hasta ahora se han estudiado muchas de sus propiedades terapéuticas. Se encuentran principalmente en las plantas y alimentos de origen vegetal. Estas sustancias vegetales llamadas flavonoides, en un primer momento se creían que eran vitaminas, pero tras la realización de investigaciones más exhaustivas se descubrió que no cumplían los requerimientos para serlo. Se han originado 13 clasificaciones, las cuales son usadas para agrupar a más de 6000 compuestos de esta familia. De esta clasificación 10 grupos presentan un esqueleto del tipo C<sub>6</sub> - C<sub>3</sub> - C<sub>6</sub> (difeníl-propano) la cual tiene dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. Se considera que su estructura deriva de la alfa-cromona (o benzo-alfa-pirona) con un fenilo en posición 2. Así pues, son 2-fenil, alfa-cromonas. Muchos de los flavonoides poseen carbonilo en la posición 4 y las variaciones se producen en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C<sub>3</sub> y en el anillo B. Son estructuras hidroxiladas en diferentes posiciones de los anillos aromáticos. Se pueden encontrar como agliconas libres o en forma de O-heterósidos o C-heterósidos, unidos generalmente a glucosa, que es el azúcar más frecuente. En general se han descrito propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerosas, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, además de presentar un número cada vez mayor de estructuras naturales así como sintéticas de probada actividad farmacológica.

## 1. PROPIEDADES GENERALES DE LOS FLAVONOIDES Y SU FUNCIÓN NATURAL

El estudio de la química de los flavonoides se ha basado, como en muchos otros casos de la química de los productos naturales, sobre la necesidad de conocer las relaciones que existen dentro de los seres vivos que les dan origen con el medio que les rodea, y como éstos pueden tener un efecto terapéutico sobre los seres humanos. El estudio constante que muchos Químicos han desarrollado en la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades farmacológicas de valor para la medicina, ha permitido, que los flavonoides sean considerados como el grupo de sustancias naturales con mayor potencial y estudio en los últimos años. Así, esta familia de compuestos ha prometido, desde hace muchos años, un papel importante dentro de la investigación clínica y farmacológica a desarrollarse en un futuro.

Sus múltiples propiedades biológicas observadas experimentalmente y su abundancia en la dieta humana, así como su presencia en numerosos remedios de la medicina tradicional, los convierten en posibles candidatos a explicar la asociación encontrada entre el consumo de determinados productos de origen vegetal y la disminución del riesgo de presentar determinadas enfermedades crónicas.<sup>1,2</sup>

Hay que recordar que los flavonoides han existido en la naturaleza por alrededor de mil millones de años,<sup>3</sup> siendo generados y preservados en el reino vegetal por mecanismos evolutivos. Los flavonoides aparecieron por primera vez en los ancestros de las embriofitas, que comprende al grupo monofilético de todas las plantas terrestres, desde los musgos hasta las angiospermas. Se cree que los flavonoides fueron una de las adaptaciones clave para la transición a la vida terrestre desde el alga verde ancestral, debido a su capacidad de absorber la radiación ultravioleta, mucho más

intensa en la atmósfera que en el agua. En cuanto al número total de estos compuestos, no existe un consenso claro en cuanto a su número, ya que existen estudios que reportan desde 4500,<sup>4,5,6</sup> en el inicio del estudio de los flavonoides, hasta 9000 en algunos de los reportes más recientes,<sup>7</sup> otros siguen manteniendo cifras más conservadoras.

Así los flavonoides han interactuado con los organismos que les rodean, claramente los flavonoides tienen un importante propósito en la naturaleza, habiendo sobrevivido en las plantas vasculares a través de la evolución, generando una asociación entre los flavonoides con varias especies de animales, y otros organismos a través de este proceso, como por ejemplo, participando en la comunicación hormonal que se da en algunas plantas, lo cual da cuenta de la gran variedad de actividades bioquímicas y farmacológicas de estas sustancias en mamíferos y otros sistemas celulares.

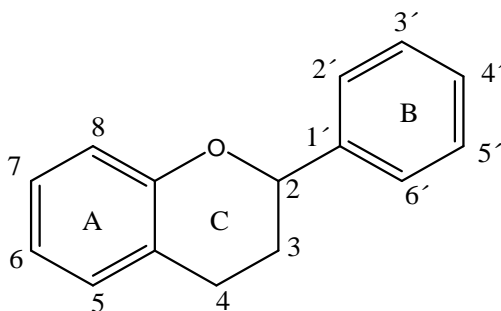
Desde que en 1930 el científico húngaro Albert Szent-Györgyi, ganador del premio Nobel de Fisiología y Medicina (por el descubrimiento de la vitamina C) les diera el nombre de "vitamina P", término acuñado para indicar que estos compuestos tenían la capacidad de disminuir la permeabilidad capilar (y fragilidad) en vasos capilares. En las últimas décadas se han descrito una constelación de propiedades, mencionándose principalmente las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, antihemorrágicas, vasodilatadoras, antineoplásicas, antivirales, antibacterianas, antialérgicas y hepatoprotectoras. A partir de esto, los flavonoides han ido ganando interés como potenciales agentes terapéuticos frente a una amplia variedad de enfermedades.<sup>8,9</sup>

Los compuestos flavónicos son los responsables de los colores amarillos de las flores, frutos, hojas, cortezas, raíces de los vegetales; así mismo, las antocianinas, pigmento flavónicos solubles en agua, confieren coloración

naranja brillante, rosa, rojo, violeta, escarlata y azul a los pétalos y frutos de plantas superiores. Las mezclas de flavonoides y terpenos parecen actuar como filtro de la radiación ultravioleta, como reductores del calor, agentes antimicrobianos o como ahuyentadores de los insectos en el fenómeno conocido como alelopatía.

### 1.1 Estructura

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpirano ( $C_6-C_3-C_6$ ), compuesto por dos anillos fenólicos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano.



**Fig. 1.** Estructura básica y sistema de numeración. Flavona; (2-fenilcromano: IUPAC).

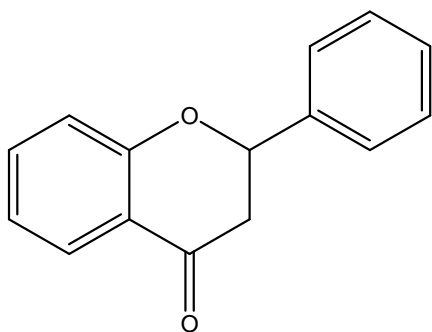
Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8 comenzando por el oxígeno del anillo C, y los del anillo B desde el 1' al 6' (Fig. 1). Hay que hacer notar que los carbonos entre los anillos A y B no se enumeran por no ser sustituibles. Los flavonoides se clasifican en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central del anillo C, la posición y número de hidroxilaciones, y hasta la posición del anillo B que puede existir en el carbono 3 y 4 del anillo C.

El término flavonoide tomado en su más amplio sentido se aplica a estructuras diversas, en las cuales se agrupan a los principales flavonoides:

- Flavanonas: Naringenina, Eriodictiol, Hesperidina y Pinocembrina.
- Flavonoles: Quercetina Kaempferol, Galangina, Fisetina y Miricetina.
- Flavonas: Apigenina, Diosmetina y Luteolina.
- Flavanonol: Taxifolina
- Flavanol: (+) Catequina, (-) Epicatequina y (-) Epigallocatequina.
- Isoflavonas: Genisteína, Daidzeína, Tectorigenina y Formononetina.
- Chalconas: Floretina, Isosalipurpurina y Retrochalcona.
- Antocianidinas: Cianidina, Pelargonidina, Peonidina, Delfinidina, Petunidina y Malvidina.

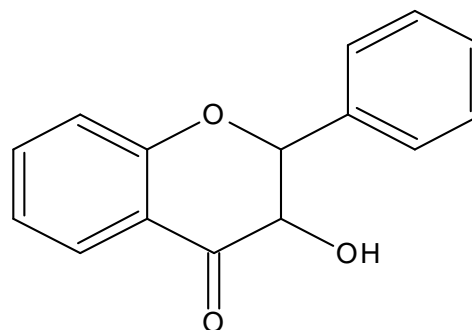
La mayoría de flavonoides presentes como agliconas, es decir sin un azúcar unido a ellos, y se les dan nombres triviales con la terminación *ina* u *ol*. Por ejemplo la apigenina corresponde a la 5, 7,4'-trihidroxi-*flavona*. En el caso de los glucósidos es muy común nombrarlos con relación al nombre trivial de la aglicona, como en el caso de la naringenina que en su forma de glucósido se le llama naringina. Aunque existen excepciones como en el caso de la quercetina que su glucósido de le denomina rutina.

**Fig. 2.** Nombres triviales y nomenclatura IUPAC de las principales familias de flavonoides.



**Flavanona**

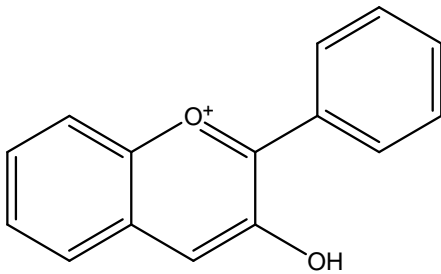
2-fenil-croman-4-ona



**Flavanonoles**

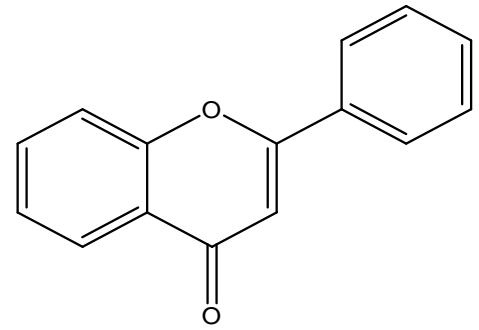
3-hidroxi-2-fenil-croman-4-ona





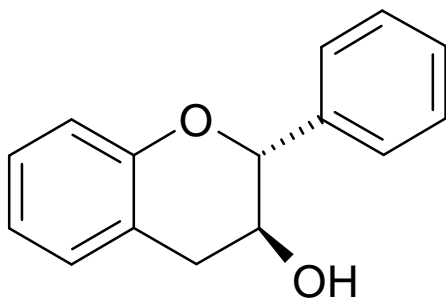
**Antocianidina**

cación 3-hidroxi-2-fenil-cromenilium



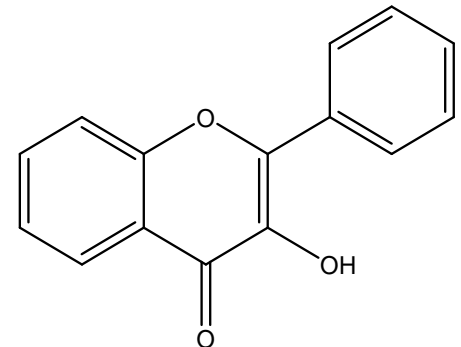
**Flavona**

2-fenil-cromen-4-ona



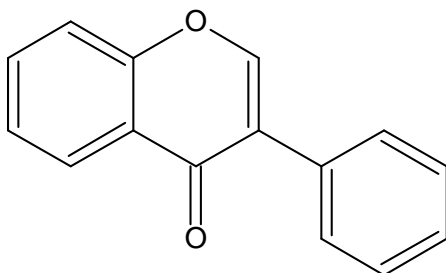
**Flavanol; Catequinas**

2-fenil-croman-3-ol



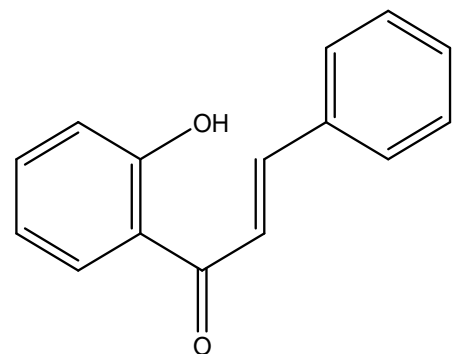
**Flavonol**

3-hidroxi-2-fenil-cromen-4-ona



**Isoflavonas**

3-fenil-cromen-4-ona



**Chalcona**

1-(2-hidroxi-fenil)-3-fenil-propenona

**Fig.2.** Continuación

Sobre estas estructuras se pueden producir hidroxilaciones, metilación de grupos hidroxilo o del núcleo, así como dimerización y polimerización, además de la formación de O- y C-glucósidos que son como se encuentran principalmente en las fuentes naturales. Ramnosa, fructosa y glucosa, son los azúcares más comunes encontrados en los flavonoides de origen natural.<sup>10,11</sup>

## 1.2 Distribución natural

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en bebidas como la cerveza, vino tinto, té verde, té negro (menor cantidad) y soya, los cuales se consumen en la dieta humana de forma habitual,<sup>286</sup> también se utilizan en la forma de suplementos nutricionales junto con ciertas vitaminas y minerales.

Se ubican principalmente en las hojas y apareciendo solo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo, a excepción de los tubérculos de la cebolla, que contienen una gran cantidad de quercetina. Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como arándano, ginkgo biloba, cardo mariano. La familia de las flavonas no suelen encontrarse en frutas pero si en cereales y en muchas plantas herbáceas.

La familia de los flavonoles se encuentra repartida abundantemente en todos los alimentos de origen vegetal, especialmente en las frutas y en menor cantidad en legumbres y hortalizas.<sup>12</sup> Los flavanoles también se encuentran en el cacao,<sup>13</sup> uva,<sup>14</sup> té,<sup>15</sup> la manzana,<sup>16</sup> y diversas bayas.<sup>17</sup> Las flavanonas como hesperidina y naringenina se encuentran prácticamente restringidas a frutos cítricos.<sup>18</sup> Las chalconas son compuestos minoritarios, que los encontramos en manzanas y fresas principalmente (floreína).<sup>19</sup> Las isoflavonas con actividad estrogénica se encuentran principalmente en legumbres y más concretamente en la soya y los productos derivados de esta como el tofu, la leche de soya, la proteína vegetal texturizada y la harina.<sup>20</sup>

Las proantocianidinas y sus glúcidos las antocianidinas, se localizan en las semillas de las uvas y en las cerezas respectivamente, a las que confieren el color rojo y rojo azulado, así como en la mayoría de las frutas coloridas. En general son pigmentos naturales de coloración comprendida entre el naranja y el violeta pasando por el rojo.<sup>21</sup>

En las plantas se pueden encontrar en diferentes partes, especialmente en las partes aéreas se les encuentra en forma libre (agliconas), como glucósidos, como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros.<sup>22</sup> Los glucósidos pueden ser de dos clases una con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como O-glucósidos, otra con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glucósidos. De todas estas formas naturales, los O-glucósidos son los más comunes de hallar. Por su parte las antocianinas se encuentran como sales, principalmente en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van del rojo hasta el violeta y el azul, siendo estas muy comunes identificándose por el colorido que dan a las hojas de ciertas plantas.<sup>23</sup>

### 1.3 Flavonoides, su importancia nutricional

Los flavonoides son los mayores componentes nutraceuticos que se pueden encontrar en el reino vegetal. "Nutraceutico" fue un término acuñado en 1979 por Stephen DeFelice,<sup>24</sup> dicho termino es definido como; "alimento, o parte de un alimento, que provee de beneficios médicos o saludables, incluyendo la prevención o tratamiento de enfermedades". También se define como; "alimento o suplemento no toxico que tiene beneficios para la salud probados científicamente".

Los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de la ingesta de flavonoides se estima en el rango de 20-30 mg/día, excediendo a las de otros antioxidantes en la dieta, como el beta-caroteno (2-3 mg/día),

pero no a la vitamina C (70-100 mg/día).<sup>25</sup> En la pimienta negra podemos encontrar quercetina en cantidades significantes (4g/Kg), en bebidas alcohólicas como el vino tinto (donde los compuestos fenólicos se sitúan entre 1.8-4.0 g/L) y la cerveza (29nmol/L); (**Tabla 1**).<sup>286</sup> Entre los alimentos, el té es una de las fuentes principales de quercetina, principalmente en Japón y los Países Bajos, el vino tinto lo es en Italia y las cebollas en los Estados Unidos y Grecia. Así, pues los flavonoides representan una contribución importante al potencial nutracéutico de la dieta humana.

**Tabla 1.** Principales familias de flavonoides, compuesto y fuente de obtención.

<i>Familia</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Fuente Alimenticia</i>
<b>Flavonas</b>	Apigenina	Manzana (Cascara)
	Crisina	Bayas
<b>Flavonoles</b>	Kaempferol	Brócoli
	Luteolina	Apio
	Miricitina	Arándanos
	Rutina	Uvas
	Sibelina	Lechuga
	Quercetina	Aceitunas
		Cebollas
	Perejil	
	Cebollas	
<b>Flavanonas</b>	Fisetina	Cítricos y sus cascara
	Hesperetina	
	Naringina	
	Naringenina	
	Taxifolina	
<b>Flavanoles (Catequinas)</b>	Catequina	Vino Tinto
	Epicatequina	Té verde y negro
	Epigallocatequina galato	

<b>Antocianinas</b>	Cianidina	Bayas
	Delfinidina	Cerezas
	Malvidina	Frambuesa
	Pelargonidina	Uvas
	Peonidina	Vino Tinto
	Petunidina	Fresas
		Té verde y negro
	Cascaras de frutas de pigmentos oscuros	

## 1.4 Función natural

Aunque todavía no se conoce exactamente el papel que desempeñan los flavonoides, se pueden mencionar que juegan un papel importante como reguladores del crecimiento, pigmentos en flores y agentes protectores contra la radiación UV, aunque algunos autores creen que la función más importante de estos compuestos en las plantas es la de defensa contra microorganismos patógenos, como bacterias, virus y hongos.<sup>26</sup>

### 1.4.1 Resistencia a las enfermedades

Existe un extenso repertorio de metabolitos secundarios, presentes en concentraciones variables, en todos los tejidos vegetales adultos, cuya función primordial parece ser la defensa contra invasiones microbianas. A diferencia de las fitoalexinas nitrogenadas, los flavonoides se caracterizan por su estado permanente. Tienen por misión servir de barrera inicial a la propagación de bacterias u hongos dentro de los tejidos de la planta. Pueden de esta manera, ejercer una presión selectiva sobre los patógenos potenciales, estos, a medida de que avanza el tiempo desarrollan por mutación mecanismos de resistencia, y perpetúan así el ciclo de cambio por mutación en patógeno y hospedador. A

este fenómeno se debe en parte, la enorme diversidad química de los productos naturales de derivados de plantas, entre estos los flavonoides.<sup>27</sup>

En 1941 Muller y Borger<sup>392</sup> bautizaron con el nombre de fitoalexinas a los compuestos químicos sintetizados por la planta en respuesta a una invasión microbiana. En 1960 fue aislada la primer fitoalexina, que fue caracterizada por Cruickshank y Perrin de la planta de chícharo (*Pisum sativum*), este compuesto fue un isoflavonoide pterocarpano, al cual se le denominó pisatina.

Las diferentes actividades biológicas halladas para algunos de los flavonoides (antimicrobiana, antimicótica, etc.) y las evidencias experimentales de que algunos aumentan la resistencia de ciertas plantas contra diferentes infecciones y enfermedades vegetales (es decir que actúan como fitoalexinas), llevo a sugerir que estas sustancias forman parte de un mecanismo químico de defensa vegetal. "In vitro" se ha observado una función protectora que ha sido más difícil de demostrar "in vivo". Sin embargo, se puede decir que los flavonoides y compuestos relacionados son responsables, al menos en parte, de la resistencia de las plantas a las invasiones fúngicas, ya que los flavonoides más oxigenados resultan tóxicos para los hongos.

En experimentos desarrollados en el año 2000 por Brian McGonigle<sup>28</sup> de la compañía Du Pont, se logró la síntesis de glucósidos del isoflavonoide daidzeína (fitoalexina en forma de pterocarpano), en células en cultivos de las plantas de maíz (*Zea mays*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*), ya que estaban interesados en proporcionar a estos cultivos una defensa natural contra la invasión de microorganismos.

#### 1.4.2 Reguladores del crecimiento en plantas

La capacidad inhibidora de ciertas hormonas vegetales presentada por algunos flavonoides sugiere que actúan como reguladores del crecimiento vegetal.

Existe evidencia de la importancia en el crecimiento y metabolismo, los monohidroxifenoles son cofactores de la enzima ácido-indolecético oxidasa (IAA oxidasa), enzima que inhibe al ácido indolacético; este compuesto es una de las principales hormonas del crecimiento de las plantas. Por otro lado ciertos flavonoides exudados por la raíz facilitan la interacción con microorganismos rizosféricos, como las bacterias fijadoras de nitrógeno para dar lugar a la nodulación en leguminosas,<sup>29</sup> por esto se ha señalado el papel de los flavonoides en el proceso de señalización hormonal en el proceso de fijación de nitrógeno en plantas, ya que en particular hay evidencia de una relación simbiótica, como por ejemplo entre la bacteria *Sinorhizobium meliloti* y la planta de alfalfa (*Medicago sativa*) donde flavonoides como luteolina y apigenina activan genes necesarios en el proceso de fijación de nitrógeno.<sup>30,31</sup>

#### 1.4.3 Pigmento de flores

Algunos dan el color amarillo y también el nombre general a estos compuestos, dado que *flavus* en latín significa amarillo, de esta raíz deriva la palabra flavonoide. Otros proporcionan la coloración rojiza de las hojas en otoño ya que los productos de degradación de los flavonoides son responsables en gran parte de la coloración otoñal de ciertas plantas.

Sus variados colores y su presencia en tejidos como los de las flores, sugieren que participan en procesos como la reproducción favoreciendo la atracción de insectos polinizadores. Las flavonas, incoloras para los seres humanos, pueden ser detectadas por las abejas y otros insectos, capaces de ver en la región del ultravioleta, Lo cual sirve para atraerlos hacia las flores y posibilitar la polinización. También esta misma capacidad de absorber ciertas radiaciones ultravioleta, los convierte en filtros solares para proteger los tejidos vegetales de radiaciones dañinas. En este sentido, se han reportado investigaciones hechas sobre la planta petunia del genero *Arabidopsis*, que indican que la

mayor exposición a luz UV induce a la síntesis de flavonoles altamente hidroxilados.<sup>32,33</sup>

### 1.5 Biogénesis

La ruta sintética de los flavonoides es parte de una ruta más amplia que inicia en la biosíntesis de fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato provenientes del metabolismo primario en plantas, después estas dos moléculas son utilizadas para la biosíntesis del ácido shikímico. Posteriormente, dentro del metabolismo secundario el ácido shikímico es transformado en una cadena de reacciones enzimáticas para producir escalonadamente fenilalanina, ácido cinámico, y al final ácido para-coumarico, que es utilizado en la forma activa de para-coumaroil-CoA en el metabolismo secundario (**Fig.3**).

El primer paso en la ruta de la síntesis de flavonoides es catalizada por la chalcona sintasa (CHS). Tres moléculas de malonil-CoA (ruta del ac. Malónico) y una molécula de para-coumaroil-CoA (ruta del ac. shikímico ya descrita) son condensadas para generar una tetrahidroxichalcona (**Fig.3**). En ciertas especies, la acción coordinada de la chalcona sintasa y una molécula de NADPH producen una 6-desoxichalcona. Posterior a la acción de la chalcona sintasa, el siguiente paso en la biosíntesis de muchos flavonoides es catalizado por la chalcona isomerasa (CHI), la cual cataliza el cierre de un anillo, que es un paso de isomerización, para formar las 2(S)-flavanonas. Las flavanonas pueden representar el punto de ramificación más importante, porque la isomerización de estos compuestos produce isoflavonoides, además de que la introducción de un doble enlace entre C-2 y C-3 origina a las flavonas y flavonoles, mientras que la hidroxilación de la posición 3 origina a los dihidroflavonoles. La síntesis de los isoflavonoides es catalizada por 2 enzimas. La primera, isoflavona sintasa (IFS) cataliza una migración de C-2 a C-3 e hidroxilación, dando como resultado a las 2-hidroxiisoflavanonas, la



deshidratación de estas, catalizada por la isoflavona 2'-hidroxilasa, origina a los isoflavonoides genisteína y daidzeína. La segunda ruta en el metabolismo general de los flavonoides involucra la deshidrogenación de la naringenina en las posiciones C-2/C-3, la cual origina diversas flavonas como la apigenina y luteolina. Esta reacción es catalizada por la flavona sintasa (FSI), que varía dependiendo de las especies de plantas. La tercera ruta en la síntesis de los flavonoides es la 3-hidroxilación estereoespecífica de la naringenina (o sus análogos 3-hidroxilados) para producir a los dihidroflavonoles como el dihidrokaempferol (o dihidroquercetina). La enzima involucrada en esta ruta es la flavanona-3-hidroxilasa (**F3H**).<sup>34,35</sup>

### 1.6 Enzimas de la ruta biosintética de los flavonoides.

El número total de enzimas relacionado con el metabolismo de los flavonoides no está totalmente determinado, son embargo parece existir un consenso en las principales enzimas, así como en la ruta a seguir en la biosíntesis. Las principales enzimas son; **CHS**, chalcona sintasa; **CHI**, chalcona isomerasa; **FLS**, flavonol sintasa; **IFS**, isoflavona sintasa; **ANS**, antocianidina sintasa; **AS**, aurosidina sintasa; **C4H**, cinamato-4-hidroxilasa; **CHR**, chalcona reductasa; **DFR**, dihidroflavonol 4-reductasa; **DMID**, 7,2'-dihidroxi,4'-metoxiisoflavanol dehidratasa; **F3H**, flavanona 3-hidroxilasa; **F3'H**, Flavona 3' hidroxilasa; **F3'5'H**, Flavona 3'5' hidroxilasa; **FSI/FS2**, flavona sintasa; **I2'H**, isoflavona 2'-hidroxilasa; **IFR**, isoflavona reductasa; **IFS**, isoflavona sintasa; **IOMT**, isoflavona O-metiltransferasa; **LCR**, leucoantocianidina reductasa; **LDOX**, leucoantocianidina dioxigenasa; **OMT**, O-metiltransferasa; **UFGT**, **UDP** flavonoil glucosil transferasa; **VR**, vestitona reductasa. En la **Fig. 3** se presentan en un recuadro los flavonoides más representativos de los productos finales de cada ruta dentro del esquema general de biosíntesis. También se indican algunas funciones conocidas de cada clase.

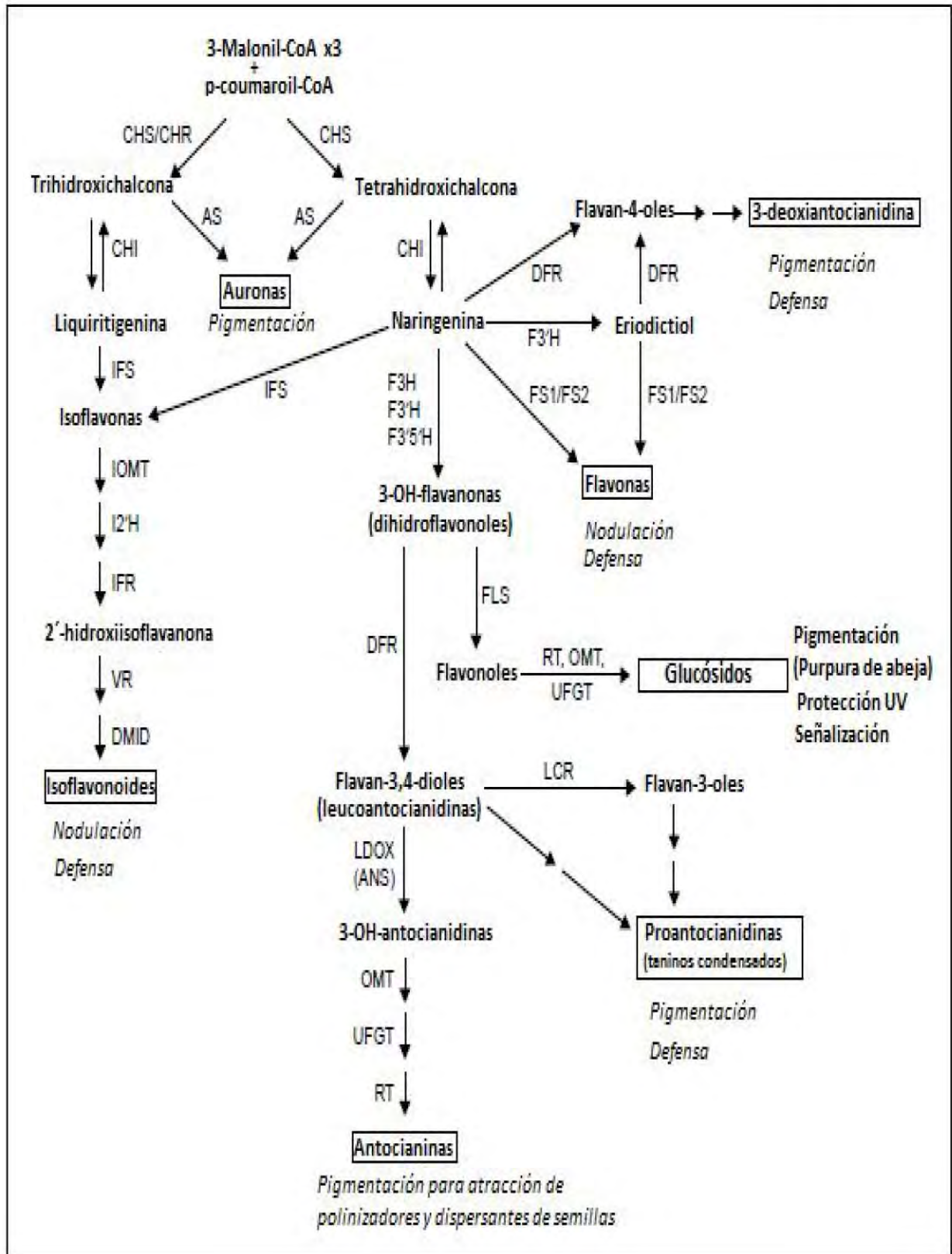


Fig. 3. Ruta biosintética de los flavonoides.<sup>36</sup>

## 2. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LOS FLAVONOIDES

El rápido crecimiento de las enfermedades degenerativas alrededor del mundo es una de las grandes amenazas para la vida y la salud de millones de personas, así como para el desarrollo económico y social. Este hecho representa el mayor reto para las instituciones de salud en el presente siglo. Se estima que más del 80% de las enfermedades cardiovasculares, y 90% de los casos de diabetes tipo II, y un tercio de los casos de cáncer pueden ser evitados realizando cambios en los estilos de vida, entre ellos la dieta. Existe por esto desde hace mucho tiempo un interés creciente en el rol de la nutrición, y en particular en sus constituyentes químicos. El hecho de que los compuestos fenólicos y los flavonoides sean constituyentes prominentes en la dieta humana los ha hecho ser el centro de un gran interés en la búsqueda de la cura y tratamiento de enfermedades.

Ya desde la década de los 90's se han realizado estudios epidemiológicos para determinar la relación entre una dieta alta en compuestos fenólicos e ingesta de flavonoides, a través de la ingesta de frutas y vegetales, con la reducción de prevalencia de enfermedades degenerativas.<sup>38,39</sup> La mayoría de estos estudios, pero no todos, han indicado en algún grado la asociación inversa entre la dieta alta en compuestos fenólicos/flavonoides y su capacidad para reducir enfermedades degenerativas.<sup>40,41</sup>

Desde que se conoció el rol crucial de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) en el estrés oxidativo, se estableció que los desequilibrios en balance oxidativo humano, es parte central en la patofisiología asociada con diferentes padecimientos, principalmente aterosclerosis, neoplasia, y enfermedades neurodegenerativas. Debido a esto se propuso que el potencial mecanismo por el cual los flavonoides presentan efectos positivos en la salud es debido a la

capacidad que tienen para neutralizar radicales libres.<sup>42</sup> La acción antioxidante de los flavonoides depende principalmente de su capacidad de reducir radicales libres y quelar metales, impidiendo así, las reacciones catalizadoras de los radicales libres. Farmacológicamente, los flavonoides destacan por su actividad sobre el sistema vascular, por su efecto antioxidante, pueden inhibir la peroxidación lipídica, y disminuir la lesión aterosclerótica, además del efecto protector de la pared vascular, debido a la disminución de la permeabilidad y al aumento de la resistencia de los capilares.

Sin embargo el mecanismo de acción de los flavonoides es muy complejo, y no es posible achacar a su capacidad antioxidante todos los efectos terapéuticos reportados (**Tabla 2**).<sup>43</sup> Por lo que se han propuesto diferentes mecanismos de acción por el cual los flavonoides ejercen su efecto terapéutico, sobre todo se ha puesto interés su capacidad regulatoria sobre cinasas y sus cascadas de señalización celular, además de su capacidad de inhibir un gran número de factores pro-inflamatorios, como iNOS, NF-kB, PCR, y COX, que se encuentran presentes en el proceso degenerativo y que se describirán en las siguientes secciones.

Propiedad descrita	Citas totales en PubMed ( 5 años*)	Referencias recientes
<b>Antioxidante</b>	20308(8622)	44,45,46,47
<b>Cardiotónica</b>	5014(1594)	48,49,50,51
<b>Anticancerígena</b>	10325(3838)	52,53,54,55
<b>Antimicrobiana</b>	9745(3035)	56,57,58,59
<b>Antiinflamatoria</b>	6123(2577)	60,61,62,63
<b>Neuroprotectora</b>	1007(595)	64,65,66,67

**Tabla 2.** Numero de citas publicadas en el portal de PubMed. Hasta *Mayo del 2012*. \* *Citas publicadas en los últimos 5 años*.

## 2.1 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue reconocida desde los años treinta,<sup>68</sup> sin embargo el mecanismo antioxidante fue desconocido en gran medida hasta hace algunas décadas. Posteriormente se describió que la acción antioxidante de los flavonoides depende principalmente de su capacidad de reducir radicales libres, catalizar el transporte de electrones, así también a la capacidad de quelar iones metálicos de transición, tales como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , impidiendo con esto reacciones catalizadoras sobre los radicales libres.

Los flavonoides retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción de dichas sustancias sobre las células. Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o la auto-oxidación de los homogeneizados de cerebro.<sup>69,70</sup> Asimismo, se ha comprobado su potente capacidad de inhibir *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas.<sup>71,72</sup>

Es por esto que se ha relacionado su capacidad antioxidante de los flavonoides con su capacidad nutracéutica. De hecho, las poblaciones que consumen productos ricos en flavonoides estadísticamente presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares. En ratas se ha podido observar que la quercetina mejora la función contráctil del ventrículo izquierdo y reduce la incidencia de trastornos de la conducción cardíaca.<sup>73</sup> El proceso se limita al área isquémica, protegiendo la estructura de las arterias coronarias, mejorando la circulación coronaria y previniendo la formación de trombos intravasculares. Por otra

parte también se han demostrado efectos vasodilatadores en aorta aislada de ratas, efectos antitrombóticos y disminución de las lesiones de reperfusión del miocardio.<sup>74</sup>

Existen diferentes pruebas experimentales mediante las cuales se han establecido las propiedades antioxidantes de diferentes flavonoides como las pruebas; ORAC,<sup>75</sup> FRAP,<sup>76</sup> TEAC,<sup>77</sup> (**Tabla 3**) y REE (**Tabla 4** ; **Tabla 5**).<sup>78</sup>

**Tabla 3.** Capacidad antioxidante de Catequinas de Té y potenciales de reducción. \*Capacidad antioxidante equivalente a Trolox.

Antioxidante	TEAC*	Potencial de Reducción (mV)
(-)-Epicatequina	2.4 ± 0.02	570
(-)-Epigallocatequina	3.8 ± 0.02	430
(-)-Epicatequina galato	4.9 ± 0.02	550
(-)-Epigallocatequina galato	4.8 ± 0.06	430
Teaflavina	2.9 ± 0.08	510
Teaflavina digalato	6.2 ± 0.43	540
Te verde (1000 ppm)	3.8 ± 0.03	n/a
Te negro (1000 ppm)	3.5 ± 0.03	n/a
Vitamina E	1.0 ± 0.03	480

**Tabla 4.** Comparación de la capacidad antioxidante de diferentes flavonoides y vitamina E.

Compuesto	Capacidad antioxidante lipofílica *
Kaempferol	1.84
Quercetina	3.27
Tamarixetina	1.14
Taxifolina	2.82
Rutina	3.18

Datiscetina	1.74
Luteolina	3.24
Galangina	1.01
(+)-Catequina	2.96
Fisetina	3.68
Hesperetina	0.20
Apigenina	0.04
Miricetina	4.08
Trimetileter miricetina	1.06
Miricitrina	3.66
Miricetina trimetil éter	1.06
Miricitrina	3.66
Morina	1.83
(±)-Catequina	3.75
(-)-Epicatequina	3.83
Epigallocatequina	3.49
Epicatequina galato	8.47
Epigallocatequina galato	9.64
<b>Vitamina E</b>	<b>2.14</b>

\*Valores son expresados como el número de radicales reducidos por mg. La capacidad antioxidante fue determinada como la habilidad de los compuestos de reducir el radical galvinoxil usando espectroscopia de resonancia del espín electrónico.

**Tabla 5.** Comparación de la capacidad antioxidante de flavonoides hidrosolubles y vitamina C.

Compuesto	Capacidad antioxidante hidrofílica*
Quercetina	1.18
Rutina	0.89
Miricetina	2.24
Miricitrina	1.88

(±)-Catequina	2.56
(-)- Epicatequina	2.96
Epigallocatequina	2.73
Epicatequina galato	3.64
Epigallocatequina galato	4.35
<b>Vitamina C</b>	<b>2.48</b>

\*Los valores son expresados como el número de radicales reducidos por mg. La capacidad antioxidante fue determinada como la habilidad de estos compuestos en solución para reducir la sal de Fermi usando espectroscopia de resonancia del espín electrónico.

Observando las tablas de infiere que la capacidad antioxidante de los flavonoides mostrados es similar a las de las de las vitamina E y C, y en algunos casos como las catequinas, presentan mejor capacidad antioxidante por presentar mayor capacidad para evitar reducir los compuestos utilizados en estas pruebas.

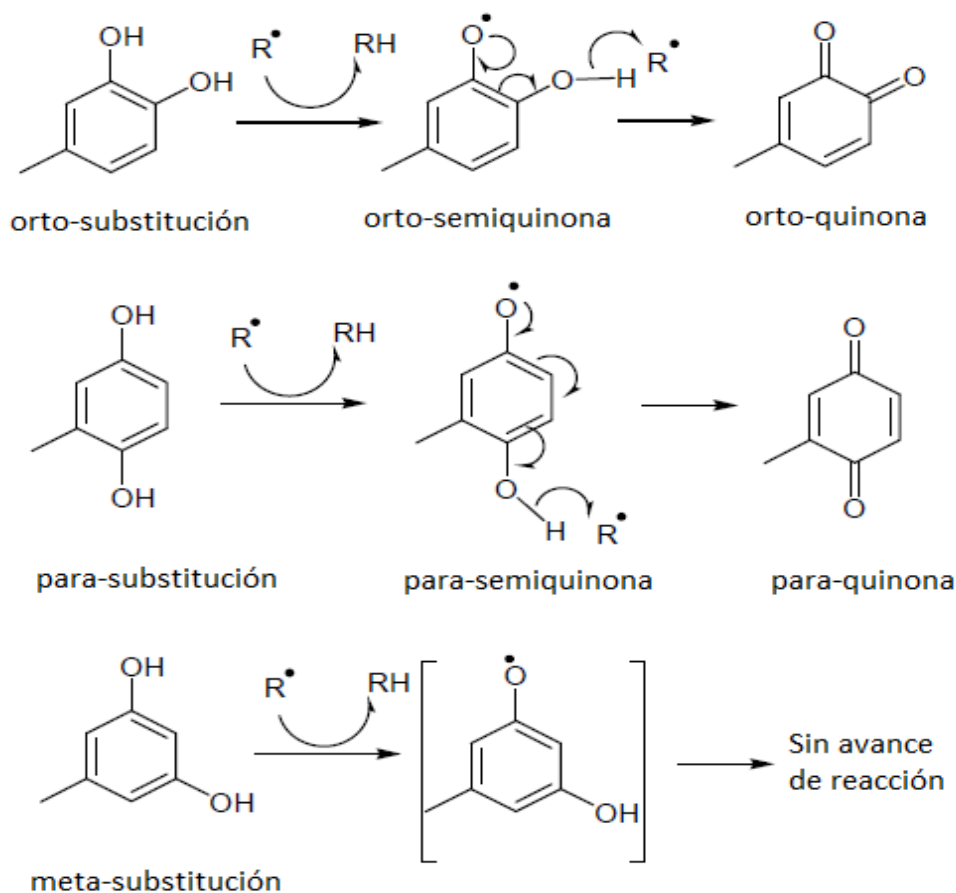
### 2.1.1 Deslocalización de Radicales

La capacidad antioxidante de muchos polifenoles *in vitro* es esencialmente resultado de la capacidad del grupo hidroxil de donar un átomo de hidrogeno a un radical libre para neutralizarlo, y posteriormente la habilidad de la estructura aromática del polifenol generado, de soportar el electrón desapareado que se genera, mediante la deslocalización dentro del sistema de electrones  $\pi$  de los grupos fenólicos. En este sentido se ha propuesto que la estructura catecólica está estrechamente relacionada con la capacidad antioxidante de diferentes flavonoides, particularmente las posiciones orto y para (**Fig.4**). Es importante observar que el producto final generado por la deslocalización del radical libre es una quinona, la cual es un producto estable y no un nuevo radical libre, este hecho es importante debido a que no se



genera un nuevo radical que pudiera ser capaz de generar una reacción en cadena que pudiera favorecer la generación de nuevos radicales libres, como en el caso de la vitamina E y C que generan radicales libres al neutralizar otros.

Conforme se ha avanzado en la caracterización estructural de un gran número de flavonoides se han ido estableciendo ciertos criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides en función de su estructura química, si bien es cierto que no existen reglas perfectamente establecidas, se puede decir que existen ciertas generalidades estructurales que se pueden relacionar con su capacidad antioxidante.



**Fig.4.** Deslocalización de radical libre en el anillo de catecol.

También, esta capacidad de reducir radicales libres se ve reflejada en los bajos potenciales redox, sobre todo en flavonoles, encontrándose estos potenciales en un rango de 0.23 V a 1.75 V (pH=7), por esto son capaces de reducir radicales libres altamente oxidantes en el rango de 1.0 V a 2,31 V, tales como los radicales superóxido ( $E_7, 0.940$  V), peroxil ( $E_7, 1.00$  V), alcoxil ( $E_7, 1.600$  V), y el radical hidroxil ( $E_7, 2.31$  V) por donación de un átomo de hidrogeno.<sup>79</sup>

### 2.1.2 Relación estructura actividad antioxidante

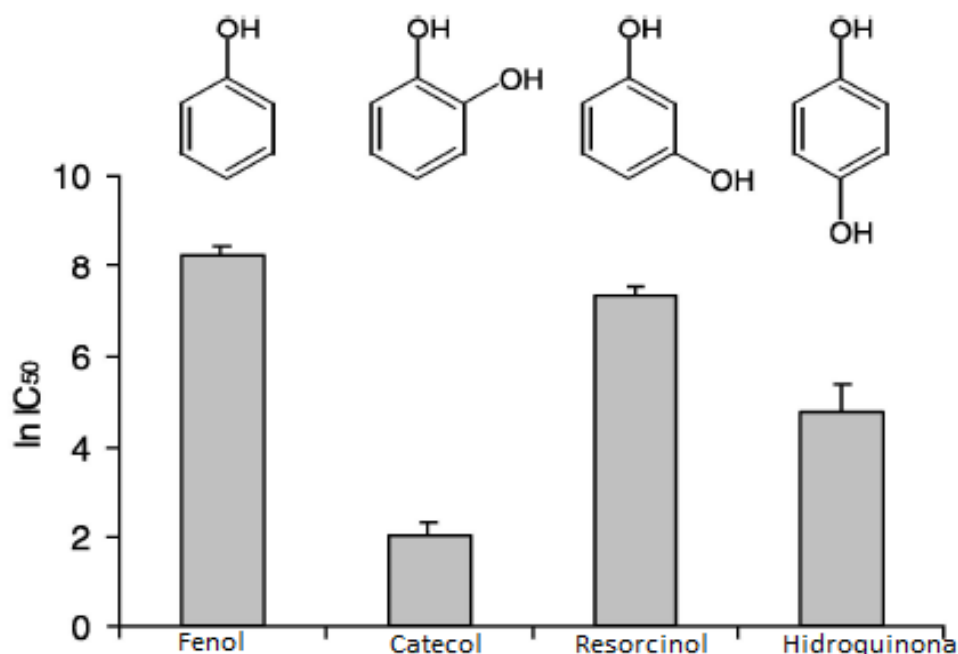
El mecanismo de acción de los polifenoles está vinculado a su capacidad para donar hidrógeno y a su acción quelante de iones metálicos; la potente actividad antioxidante reside en sus estructuras químicas con un grupo o-difenólico, un doble enlace conjugado entre los carbonos 2,3 del anillo C y grupos hidroxilos en posiciones 3 y 5,<sup>80</sup> lo que los torna muy eficientes contra radicales hidroxilo y peroxilo. Casi todos los reportes coinciden en que los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y que este efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4.<sup>81</sup> Por su parte las antocianidinas muestran muy buenas propiedades secuestrantes de RL,<sup>82</sup> sin embargo dependiendo de las condiciones experimentales, sus bajos potenciales de oxidación pueden hacer que estas se comporten también como agentes prooxidantes involucrándose en procesos de ciclaje redox.<sup>83,84</sup>

#### 2.1.2.1 Criterios estructurales en inhibición de peroxidación lipídica

Todos los criterios con los que se evalúa las posibles habilidades estructurales se basan en que los grupos -OH, estos juegan un rol central, es decir, las posibles estimaciones de la capacidad antioxidante se basan en el número de los grupos -OH así como su posición dentro de la estructura molecular.

Derivado de esto se ha sugerido que la potencia antioxidante de los flavonoides está directamente correlacionada con el número y posición de los grupos -OH presentes.

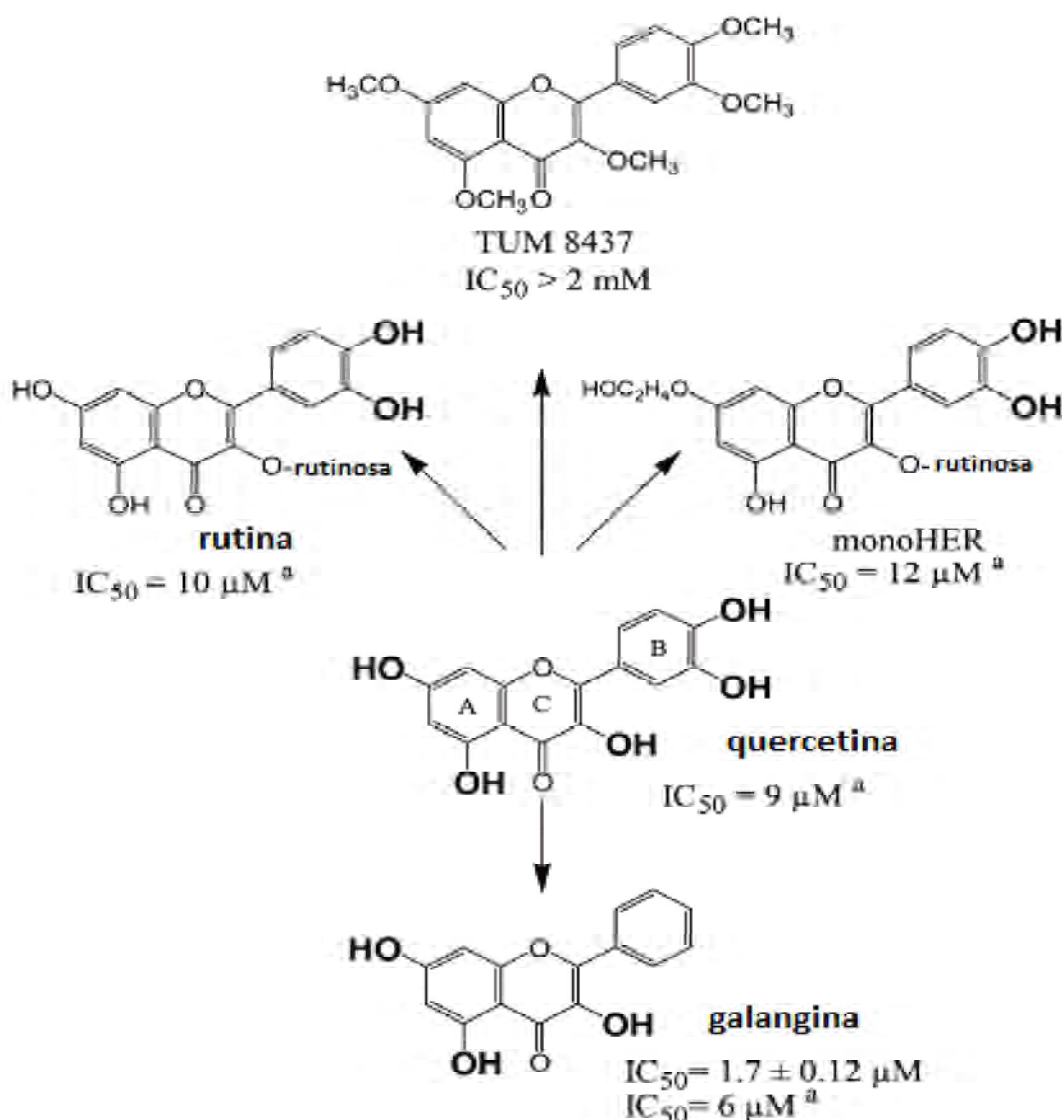
En un estudio realizado por Chantal *et al.*<sup>85</sup> se determinó la capacidad de diferentes fenoles, incluyendo algunos naturales y sintéticos, para inhibir la peroxidación lipídica. Se encontró que fenol por sí mismo es un pobre inhibidor de la peroxidación lipídica. La concentración de fenol necesaria para inhibir al 50% la peroxidación lipídica ( $IC_{50}$ ) se reportó de 4050  $\mu$ M.



**Fig. 5.** Protección contra peroxidación lipídica por varios polifenoles. La actividad es expresada como el logaritmo natural de la concentración de inhibición al 50% ( $\ln IC_{50}$ )  $n=3$ .

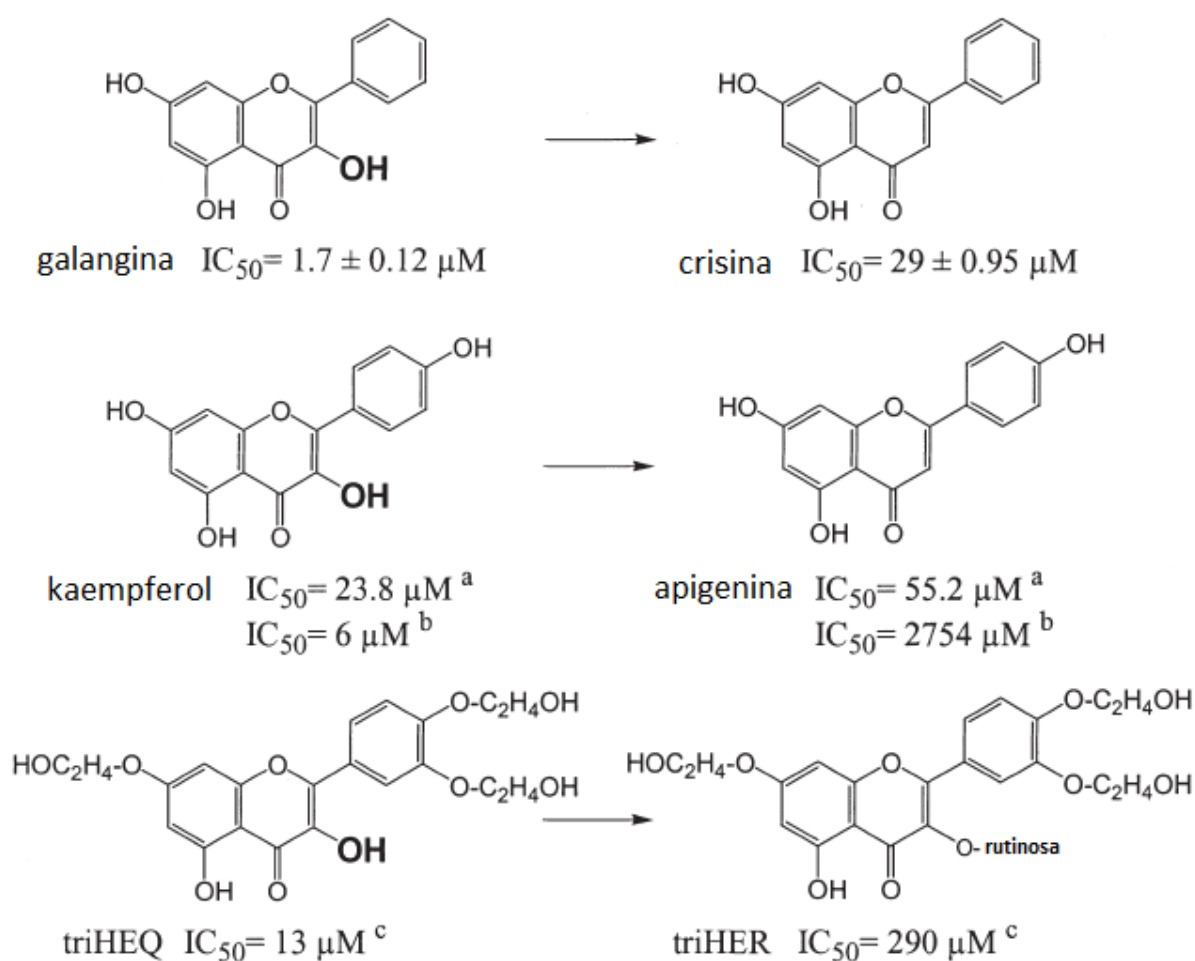
Cuando el grupo -OH se encuentra metilado, la actividad es prácticamente nula ( $IC_{50}$  anisol >7mM). Y por el contrario la dihidroxilación de fenol (catecol, resorcinol e hidroquinona) produce compuestos más activos (**Fig.5**). Así por

ejemplo, la dihidroxi-sustitución de fenol incrementa la actividad antioxidante de catecol ( $IC_{50}$ : 10  $\mu$ M) e hidroquinona ( $IC_{50}$ : 156  $\mu$ M), y sin embargo la hidroxilación en las posiciones 1 y 3, resorcinol, también incrementa la actividad ( $IC_{50}$ : 1800  $\mu$ M),<sup>85</sup> pero sin embargo lo hace mucho menos que sus dos isómeros orto y para.



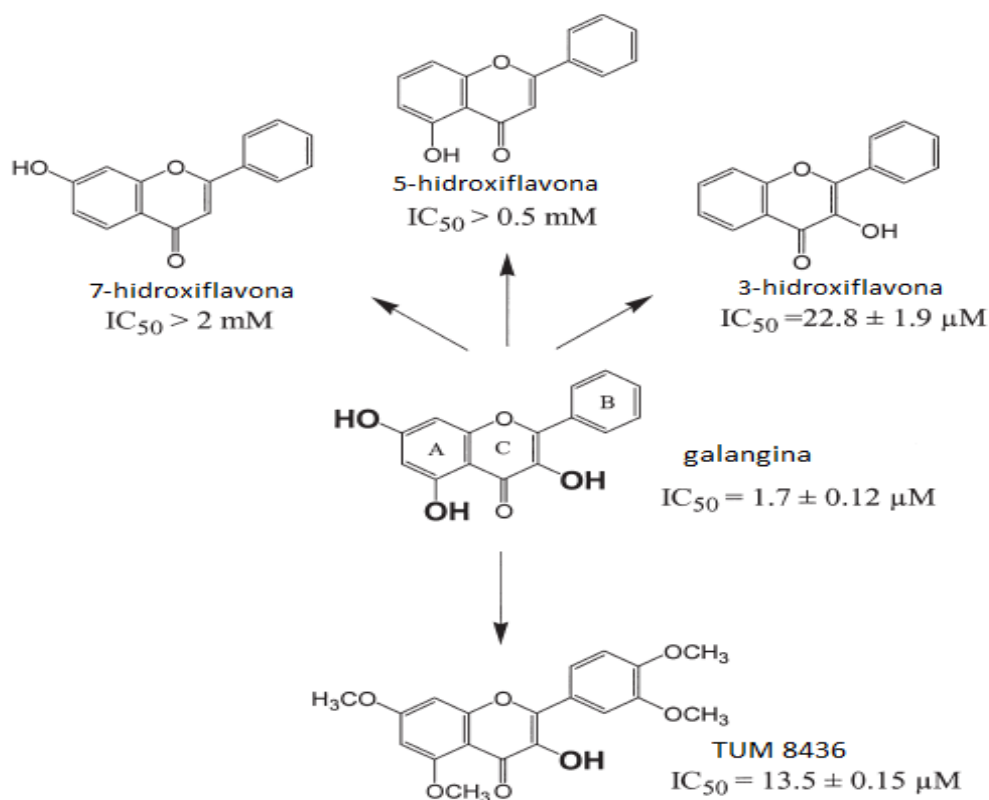
**Fig. 6.** Protección contra peroxidación lipídica de varios flavonoides. Cuando quercetina se encuentra totalmente metilada, la actividad disminuye drásticamente. Galangina que solo tiene tres grupos OH, y no tiene grupo catecol, también presenta una actividad alta contra la peroxidación lipídica. (a) dato tomado de van Acker *et al.*<sup>86</sup>

Por su parte, el flavonol quercetina tiene una alta actividad como inhibidor de la peroxidación lipídica, sin embargo cuando los 5 grupos OH se encuentran metilados, dicha actividad decrece dramáticamente (TUM 8437,  $IC_{50} > 2mM$ ; **Fig.6**). Se observa que los flavonoides con una estructura de catecol en el anillo B, son buenos inhibidores de la peroxidación lipídica (rutina y monoHER). Aunque a su vez, los flavonoides sin un grupo catecol también son altamente activos, siempre y cuando tengan un grupo 3-OH y un doble enlace.



**Fig.7.** Protección contra la peroxidación de varios flavonoides con -OH en 3. Galangina, kaempferol y triHEQ tienen una alta actividad. Disminución de la actividad cuando el 3-OH es eliminado o sustituido. (a) Mora *et al.*,<sup>393</sup> (b) Acker *et al.*,<sup>86</sup> (c) Haenen *et al.*<sup>87</sup>

En la **Fig.7** se hace la comparación entre tres flavonoides con una alta actividad contra la peroxidación lipídica, galangina y kaempferol en los que se elimina el 3-OH, o sustituido como en el caso del flavonol sintético triHEQ. Y en los tres casos se encontró que los flavonoides que tienen el grupo OH libre en la posición tres del anillo C presentan actividades considerablemente más altas que los que tienen a dicho grupo ausente o sustituido. En el caso del flavonol triHER (glucósido), es interesante observar que ni los grupos OH presentes en los grupos alquil sustituyentes, así como tampoco el 4-OH presentes en el glucósido de rutinosa, son capaces de mantener el  $IC_{50}$  del compuesto original (triHEQ), como consecuencia de su incapacidad de deslocalizar electrones en toda la estructura del flavonoide.

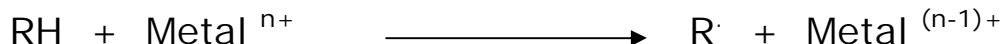


**Fig.8.** Protección de la peroxidación lipídica de derivados de galangina. Compuestos derivados de galangina con un solo grupo OH presentan pobre actividad. La actividad se incrementa cuando el OH está en la posición C-3.

De las flavonas que contienen solo un grupo OH en el anillo AC (**Fig.8**), la 3-hidroxi-flavona ( $IC_{50}=22.8 \mu M$ ) fue la que mostró mayor capacidad protectora en comparación con otros tres compuestos con un solo grupo OH en una posición diferente a la 3-OH, pero no mayor a galangina, la cual tiene tres grupos OH. El orden decreciente de actividad es; galangina ( $IC_{50}=1.7 \mu M$ ) > 3-OH-flavona ( $IC_{50}=22.8 \mu M$ ) > 5-OH-flavona ( $IC_{50}>0.5 mM$ ) > 7-OH-flavona ( $IC_{50}>2 mM$ ). El compuesto TUM 8436 posee solo un grupo 3-OH libre, sin embargo también altamente activo ( $IC_{50}=13.5 \mu M$ ).

### 2.1.3 Actividad quelatante

Otro mecanismo por el cual los flavonoides ejercen su propiedad antioxidante es mediante su capacidad quelatante sobre metales de transición. La presencia de grupos hidroxilos aromáticos, que son relativamente reactivos, permite el establecimiento de puentes de hidrógeno o uniones covalentes, que genera la posibilidad de formar complejos con iones metálicos. Como por ejemplo con cobre II ( $Cu^{2+}$ ) y hierro II ( $Fe^{2+}$ ), lo cual puede limitar la actividad de estos iones para interactuar con proteínas, o para hacerlo con moléculas más simples, tales como el radical hidroxilo, o intervenir en reacciones de oxidación y reducción. La interacción entre flavonoides y metales suele darse fundamentalmente entre los grupos 3-hidroxi y 4-carbonil y entre 3'-hidroxi y 4'-hidroxi. Es de esperar que los flavonoides presenten actividad antioxidante mediante este mecanismo, ya que los metales pesados son potentes generadores de radicales libres vía la reacción de Fenton. Así, metales de transición como el hierro y el cobre son capaces de acelerar la iniciación y propagación del proceso de peroxidación lipídica por el siguiente mecanismo:



## 2.2 PROPIEDADES CARDIOTÓNICAS

Como ya se ha dicho, desde hace muchos años se han dado a conocer en varios reportes la capacidad antioxidante de distintos flavonoides, así como su capacidad para bloquear la acción de los radicales libres sobre sistemas *in vitro*. Sin embargo este mecanismo cobró importancia cuando se descubrió que se encontraba directamente relacionado con la capacidad de ejercer ciertos efectos cardio-protectivos, sobre todo cuando al inhibir la oxidación de lípidos (sobre todo de LDL) mostraron ser capaces de impedir la formación de placas de ateroma o coágulos que perjudiquen el correcto funcionamiento del músculo cardíaco y su sistema arterial. Es por ello que la capacidad antioxidante de algunos flavonoides se encuentra estrechamente ligada con sus efectos cardio-protectores.

Hertog fue uno de los primeros interesados en investigar los efectos cardioprotectores de los flavonoides. En la década de los 90´s Hertog reportó un par de estudios, el primero es un estudio prospectivo que mostró una relación inversa significativa entre la ingesta total de flavonoides y mortalidad por enfermedad coronaria sobre un periodo de 5 años consecutivos en hombres ancianos.<sup>88</sup> También reportó una correlación inversa entre el consumo de flavonoides y la mortalidad provocada por enfermedad cardiaca coronaria sobre un periodo de 25 años en un total de 16 grupos de personas pertenecientes a siete países.<sup>89</sup>

Más recientemente en un estudio del 2005 realizado por Arts IC y Hollman PC.,<sup>90</sup> reportaron doce estudios prospectivos donde investigaron los efectos de la ingesta de flavonoides sobre la enfermedad coronaria. Mientras que cinco de estos estudios evaluaron en particular la correlación entre el consumo de flavonoides y la prevalencia de infartos. Como resultado se encontró, en cuanto a la enfermedad coronaria cardiaca, que siete de doce de estos



estudios apoyan la acción protectora de los flavonoides, mientras otros dos estudios indican que los mismos compuestos pueden proteger de infarto. Algunos de los flavonoides mencionados son: quercetina, kaempferol, y en menor intensidad genisteína y la luteolina que tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación.

Sin embargo se ha descubierto que el mecanismo molecular en el que ciertos flavonoides ejercen protección cardiaca va más allá de solamente relacionarlo con sus propiedades antioxidantes. Ya que también juegan un papel importante sobre la vías de señalización celular, así como en la inhibición de ciertas enzimas, ya que ciertos flavonoides como quercetina y en particular kaempferol son capaces de modular la producción de NO (óxido nítrico) a través de la enzima NOS (óxido nítrico sintasa).

### **2.2.1 Modulación de la producción de óxido nítrico (NO)**

El NO es un potente vasodilatador y neurotransmisor, además de de que se ha encontrado que es capaz de inhibir la agregación plaquetaria y la adhesión de monocitos sobre el endotelio cardíaco.<sup>91</sup> En el miocardio el NO regula, entre otros procesos, el acoplamiento excitación-contracción, la frecuencia cardíaca, el tono vegetativo, la respiración mitocondrial (metabolismo energético), así como los procesos de hipertrofia y apoptosis. A escala vascular, el NO regula el tono vascular, la perfusión coronaria, la permeabilidad capilar y, además, desempeña un papel importante en el control de la angiogénesis, la inflamación y la proliferación celular vascular. Por lo que se ha relacionado que una baja en la biodisponibilidad de NO propicia disfunción en el endotelio cardíaco.<sup>92,93</sup>

El NO es producido por la enzima NOS a partir del aminoácido L-arginina. Existen tres isoformas de la NOS, primero la eNOS que está presente principalmente en el endotelio; nNOS que se encuentra principalmente en el

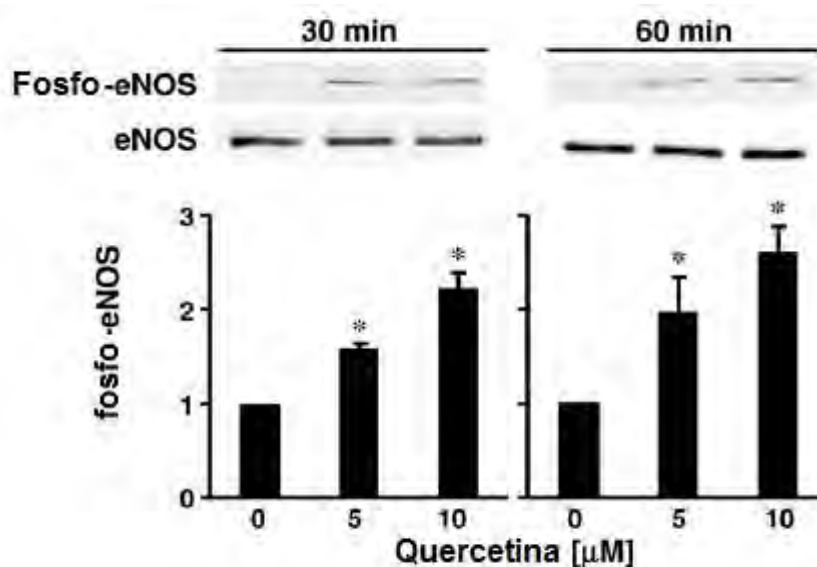
sistema nervioso y iNOS que es inducible por factores inflamatorios y que se encuentra principalmente en macrófagos. Las dos primeras isoformas son las responsables de mantener el nivel basal de NO, mientras que la iNOS se expresa en macrófagos cuando existen procesos de defensa e inflamación, por lo que se ha propuesto que elevados niveles de esta isoforma, se relacionan directamente con alteraciones cardíacas. El NO que es producido en las células endoteliales de los vasos sanguíneos funciona como regulador paracrino, se difunde al interior de las células musculares lisas, donde induce la producción de GMPc (guanosín monofosfato cíclico) por la enzima guanilato ciclasa, que a su vez produce un efecto de relajación en la musculatura. Un estudio reciente muestra la capacidad de isoflavonas de soya para incrementar la actividad de NO y la biodisponibilidad de NO en ratas. Este estudio sugiere que una dieta de isoflavonas de soya tiene efectos benéficos para tratar factores de riesgo cardiovasculares lo cual tiene influencia en el perfil de lípidos y enzimas relacionadas.<sup>130</sup>

### 2.2.1.1 Vasorelajación por modulación de NO

En años recientes se ha investigado en el mecanismo a través del cual los flavonoides ejercen efecto cardioprotector. En este esfuerzo se ha puesto las bases para elucidar este mecanismo. En este sentido muchos estudios *in vitro* investigaron el efecto de relajación en arterias aisladas. Después del estudio inicial de Fitzpatrick *et al.*<sup>94</sup> en aortas de ratas tratadas con vino tinto y productos de uva, otros reportes confirmaron el efecto vasodilatador de polifenoles derivados de vino tinto,<sup>95</sup> cocoa,<sup>96</sup> y te.<sup>97</sup> Después, estos descubrimientos fueron comprobados por Benito *et al.*<sup>98</sup> que reportaron que la actividad de la eNOS en homogenizados aórticos de ratas alimentadas con una dieta alta en flavonoides, fue significativamente más alta que en el grupo control, lo que produjo un aumento de la producción de NO basal, he indujo la vasorelajación del endotelio.

### 2.2.1.2 Quercetina y su acción promotora de eNOS

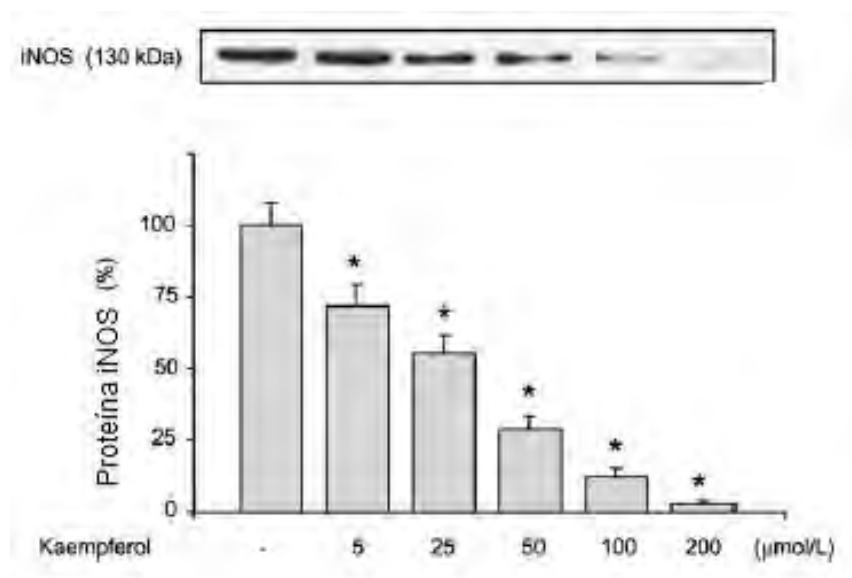
En un estudio realizado en 2010 por Nicholas K.H.<sup>99</sup> se describieron varios efectos que el flavonol quercetina ejerce sobre el tejido cardiaco. Primeramente es capaz de aumentar producción de NO mediante su capacidad de favorecer la fosforilación de eNOS, lo que aumenta su actividad, y que conduce a la vaso-relajación aortica después de tratar con 5 $\mu$ M de quercetina durante 30 y 60 min. (**Fig.9**) Otro efecto reportado es que la quercetina es capaz de atenuar la contracción causada por fenilefrina en vasos sanguíneos aórticos de ratas, que fueron tratados con 5 y 10  $\mu$ M durante 30 min. Así mismo también se reportó que la quercetina es capaz de aumentar los niveles de cGMP en segmentos de aorta de ratas sometidos a 5  $\mu$ M durante 60 min. El flavonol quercetina también aumenta el nivel intracelular de Ca<sup>2+</sup> en células endoteliales de aorta bovina, lo que favorece la producción de NO mediante las enzimas eNOS y nNOS que son calcio-dependientes, y lo que produce un aumento del NO basal.



**Fig.9.** Aumento proporcional del nivel de fosforilación de eNOS en función de la concentración de quercetina.

### 2.2.1.3 Kaempferol disminuye expresión de iNOS

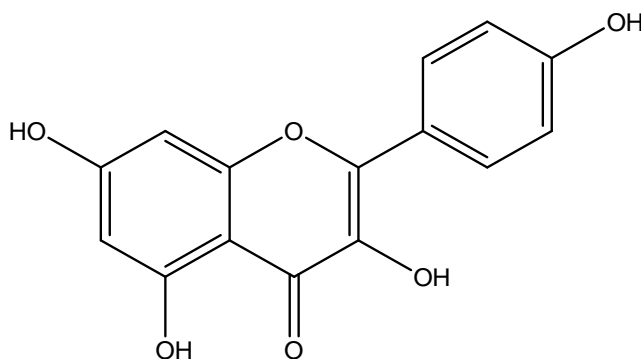
En un estudio de Victoria García-Mediavilla *et al*,<sup>100</sup> reportaron un estudio donde se describe la capacidad de los flavonoles quercetina y kaempferol (**Fig 11.**) de modular negativamente la expresión de la enzima iNOS en células hepáticas. En este trabajo se encontró que en particular kaempferol es más efectivo que quercetina en inhibir la expresión de iNOS. Se probaron diferentes concentraciones de ambos flavonoles y se encontró que a medida que se aumentaba la concentración de kaempferol la expresión de iNOS disminuyó proporcionalmente (**Fig.10**), mientras que en quercetina esta respuesta fue menor.



**Fig.10.** Expresión de la isoforma inducible iNOS de manera inversa a la concentración de kaempferol. A una concentración de 200μM se alcanza una inhibición cercana al 95%.

Este estudio es de gran relevancia debido a que la sobreproducción de NO formado es un factor importante a considerar en el deterioro orgánico, ya que se considera que en exceso puede conducir a la formación de especies reactivas de nitrógeno (ERN), es especial el ion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), el cual es un potente oxidante. También porque las especies reactivas de nitrógeno

(ERN) contribuyen en gran medida a la patología de enfermedades cardiovasculares, por la gran degeneración celular y tisular que generan. Además se ha observado que en los sitios donde se produce inflamación, se produce un aumento en la enzima oxido sintasa inducible (iNOS), activándose así una sobreproducción de NO. Generando con esto un proceso crónico de inflamación, resultando en diversos efectos como la aceleración de la aterogénesis y el comienzo de eventos aterotrombóticos, lo que conlleva a la larga un daño en la función cardíaca.



**Fig.11.** Kaempferol. Flavonol aislado de diversas fuentes: té verde, brócoli, orégano, jengibre y avellana.

#### 2.2.1.4 NO como fuente de especies reactivas de nitrógeno (ERN)

El exceso de NO aumenta la posibilidad de generar ERN, como, el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que es un potente oxidante generado por la reacción entre monóxido nítrico (NO) y el ion superóxido en el endotelio vascular, el cual es capaz de inducir la oxidación de LDL.<sup>101,102</sup> En contraste existe evidencia de la capacidad de los flavonoides en regular la generación de peroxinitrito generado a partir de NO.<sup>103,104</sup> De esta manera se ha propuesto a este mecanismo de regulación de NO y de las ERN, como la causa más importante de los beneficios cardiovasculares derivados de la dieta rica en flavonoides.<sup>105,106</sup> En particular

el endotelio juega un papel importante en mantener la homeostasis vascular, mientras que el estrés oxidativo ha sido implicado en la enfermedad vascular.

Por lo que gracias a estas investigaciones es posible establecer los criterios más relevantes que producen disfunción endotelial, relacionando el incremento del estrés oxidativo, con la baja de la biodisponibilidad de NO basal y sobreproducción de NO por iNOS, y como los flavonoides pueden modular este equilibrio.<sup>107</sup>

### 2.2.2 Flavonoides inhiben oxidación de LDL

La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL; por sus siglas en inglés) está muy relacionada con el desarrollo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica de manera que, reduciendo la susceptibilidad de las LDL a la oxidación con antioxidantes exógenos como los flavonoides, de esta manera estos se pueden convertir en un factor importante en la prevención de este tipo de cardiopatías. De esta manera la ingesta de flavonoides ha sido relacionada con una disminución de la morbilidad y mortalidad por cardiopatías en varios estudios epidemiológicos. Ya que el consumo dietario de flavonoides se ha mostrado estar inversamente relacionado con morbilidad y mortalidad de sujetos con enfermedad coronaria.<sup>108</sup>

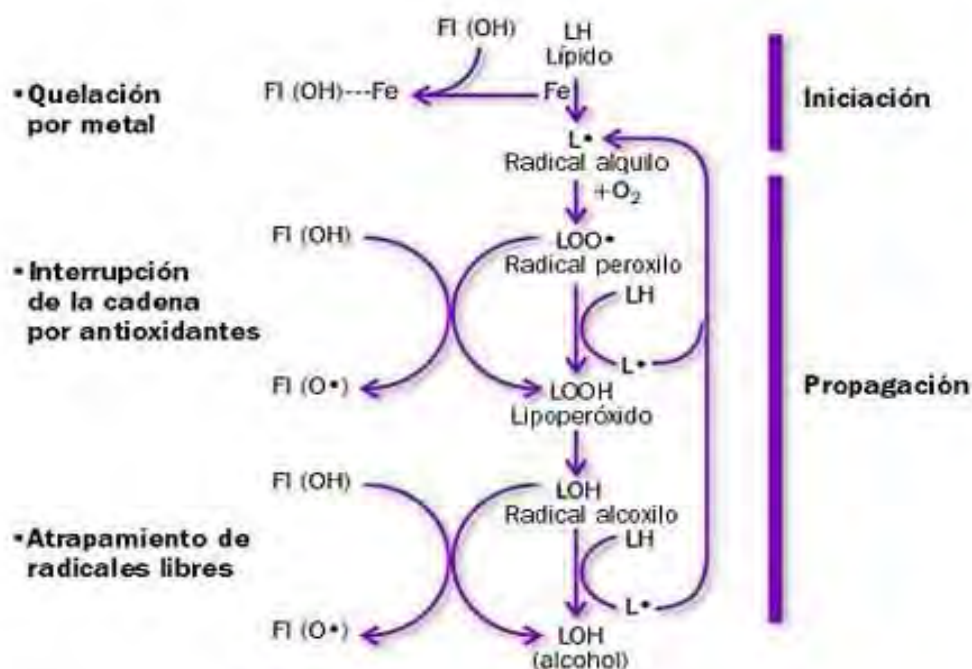
Algunos flavonoides actúan como antioxidantes vía sus propiedades de quelación de iones metálicos, reduciendo la capacidad del metal para generar radicales libres. Sin embargo, los mecanismos de acción por los cuales los flavonoides inhiben la oxidación de las LDL *in vitro* no están totalmente claros.

Se han planteado algunas explicaciones. Primero: podrían reducir la generación o liberación de radicales libres en los macrófagos o podrían proteger al alfa-tocoferol en las LDL de ser oxidados por los mismos radicales libres. Segundo: los flavonoides podrían regenerar el alfa-tocoferol activo

donando un átomo de hidrogeno al radical alfa-tocoferilo, el cual se forma cuando transfiere su propio OH a un radical para terminar la cadena de la reacción de la per oxidación lipídica. Tercero: los flavonoides podrían secuestrar iones metálicos, tales como hierro y cobre, disminuyendo los radicales libres generados en el medio.

Así los flavonoides pueden actuar como potentes inhibidores de la oxidación de LDL, vía varios mecanismos:

- Neutralización de radicales libres
- Quelación de metales de transición
- Protege de la oxidación a la vitamina E y carotenoides.
- Regeneración de vitamina E a partir del  $\alpha$ -tocoferol
- Preservación de la actividad de la paraoxonasa sérica (PON 1; proteína antioxidante)



**Fig. 12.** Principales mecanismos de acción inhibitoria de la peroxidación lipídica debido a flavonoides.

Se reporta que los flavonoides quercetina, rutina y luteolina son efectivos inhibiendo la oxidación de LDL inducida por iones de cobre.<sup>109</sup> En este estudio también se reportan que entre las diferentes familias de flavonoides, flavonoles, flavanoles e isoflavonas son los protectores más potentes de LDL contra la oxidación inducida por iones de cobre.

### **2.2.3 Disminución de placas de colesterol y aterosclerosis**

La aterosclerosis es la principal causa de morbilidad y mortalidad entre personas con un estilo de vida occidental. Se define a la aterosclerosis como la deposición de plaquetas ricas en colesterol y lípidos sobre las paredes arteriales, lo que propicia inflamación y endurecimiento arterial, por lo que se considera como un factor central que favorece el desarrollo de lesiones sobre el tejido cardíaco. La hipótesis oxidativa de la aterosclerosis propone que la oxidación de LDL juega un papel central en la primera etapa en la aterogénesis.

Se reconoce que niveles elevados de LDL y especialmente LDL oxidada son factores de riesgo en la enfermedad arterial coronaria. Ya desde la década de los 90's se ha demostrado que ciertos flavonoides eran inhibidores de la modificación de LDL por macrófagos en ratones. Los flavonoides también son capaces de inhibir la oxidación de las células libres de LDL mediadas por  $\text{CuSO}_4$ . Parece que los flavonoides actúan protegiendo las LDL contra la oxidación causada por macrófagos, al inhibir la peroxidación de lípidos hidroperóxidos. Así los flavonoides protegen a las LDL de la oxidación, manteniendo sus niveles por periodos de tiempo más prolongados, y retardando el comienzo de la peroxidación de lípidos.

Existen investigaciones en las que se indica que el consumo de alimentos ricos en flavonoides (antocianinas, flavonoles y proantocianidinas), tales como arándanos y moras, puede disminuir el riesgo de aterosclerosis. Además en



estos experimentos *in vitro* y también *in vivo* se demostró la capacidad de inhibición de la oxidación de LDL.<sup>110</sup> Recientemente se reportó un estudio en el cual se describe la capacidad de de la planta *Astragalus mongholicus*, usada en la medicina tradicional china y la cual es rica en isoflavonas, para disminuir los niveles plasmáticos de colesterol total y de LDL en ratones, a los cuales se les indujo aterosclerosis. Se encontró además de que estas isoflavonas eran efectivas en neutralizar a los radicales superóxido e hidroxilo.<sup>111</sup>

La hipótesis es soportada por la evidencia que la oxidación de LDL ocurre *in vivo* y contribuye a la manifestación clínica de la aterosclerosis. La asimilación de LDL oxidadas (Ox-LDL) promueve la acumulación de colesterol y formación de células esponjosas. La oxidación de LDL involucra el ataque de radicales libres sobre los componentes de las lipoproteínas, incluyendo colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos y apolipoproteína B-100, por lo que se considera a estas moléculas como el sitio donde los flavonoides ejercen su acción antioxidante *in vivo*.

También hay otros factores en el desarrollo de aterosclerosis, como el proceso de inflamación provocado por la adhesión de células del sistema inmune. Un estudio de este año muestra la capacidad de la flavanona naringenina para reducir la adhesión de monocitos sobre la pared del endotelio y las paredes vasculares en ratones alimentados con una dieta alta en grasas, a los cuales se les dosificó naringenina al 0.02% en peso por 18 semanas.<sup>112</sup>

#### **2.2.4 Protección de vino tinto contra oxidación de LDL**

El efecto benéfico del vino tinto radica en su capacidad de prevenir el desarrollo de la aterosclerosis, que es atribuido en parte a su contenido alcohólico, pero la mayor parte de su actividad antioxidante es atribuida a sus polifenoles. El vino tinto contiene un rango muy amplio de polifenoles provenientes principalmente de la piel de la uva. El vino tinto contiene los

flavonoles quercetina y miricetina (10-20 mg/L), los flavanoles catequina y epigallocatequina (más de 270 mg/L), taninos condensados (polímeros de catequina y epicatequina; 2500 mg/L), y polímeros de antocianidinas. En otros estudios, el vino tinto, el cual contiene una concentración más alta de polifenoles que el vino blanco, mostro ser más efectivo en inhibir la oxidación de LDL.<sup>94</sup>

### 2.2.5 Propiedades antitrombóticas

Es conocido que el daño sobre el endotelio desarrolla un estado pro-trombótico, ya que puede resultar en adhesión de plaquetas sobre su superficie, además de ser un factor para el desarrollo de aterosclerosis. Existen estudios recientes en los que se reporta que los flavonoides ejercen efecto antiplaquetario uniéndose al receptor tromboxano A2 (agregante plaquetario y vasoconstrictor).<sup>113</sup>

Se ha encontrado que alimentos ricos en flavonoides, como jugos de uva, tés, vino tinto y chocolate oscuro, presentan una particular actividad antitrombótica, no solo por aumentar la biodisponibilidad de NO en el endotelio sino por reducir la reactividad plaquetaria.<sup>114,115</sup> Sin embargo, dada la complejidad química de estos alimentos, no es fácil saber cuáles efectos son debido a la influencia de los flavonoides y cuales a otro a otro tipo de compuestos. Por lo que se han hecho estudios en los que se estudian las propiedades de algunos flavonoides aislados.

Se ha reportado que los flavonoides quercetina y catequina actúan sinérgicamente para reducir la agregación plaquetaria.<sup>116</sup> Una patente aprobada en los Estados Unidos en 2001 demuestra la capacidad de la naringina, naringenina, hesperidina y hesperetina de las cascaras de los cítricos de inhibir la agregación plaquetaria estimulada por colágeno en plasma humano rico en plaquetas.<sup>117</sup>

También existen preparados comerciales como Daflon (500mg) que contiene 90% de diosmina y 10% de hesperidina, el cual inhibe la agregación plaquetaria intravascular inducida mediante una dosis de 100mg/día.<sup>118</sup>

### **2.2.6 Actividad vasodilatadora**

Una gran variedad de flavonoides han mostrado la habilidad de dilatar los vasos sanguíneos,<sup>119</sup> en particular se reportan flavonas y flavanonas como potentes vasodilatadores.<sup>120,121</sup> El mecanismo de vasodilatación no está totalmente elucidado aún. Pero parece ser causado al menos parcialmente, en la capacidad de inhibir el flujo de calcio incluso en la presencia de antagonistas del canal de calcio.<sup>122</sup> Aunque este mecanismo no explica totalmente la actividad vasorelajante. Por ejemplo las isoflavonas también ejercen vasorelajación, pero lo hacen incrementando la liberación de NO.<sup>123</sup>

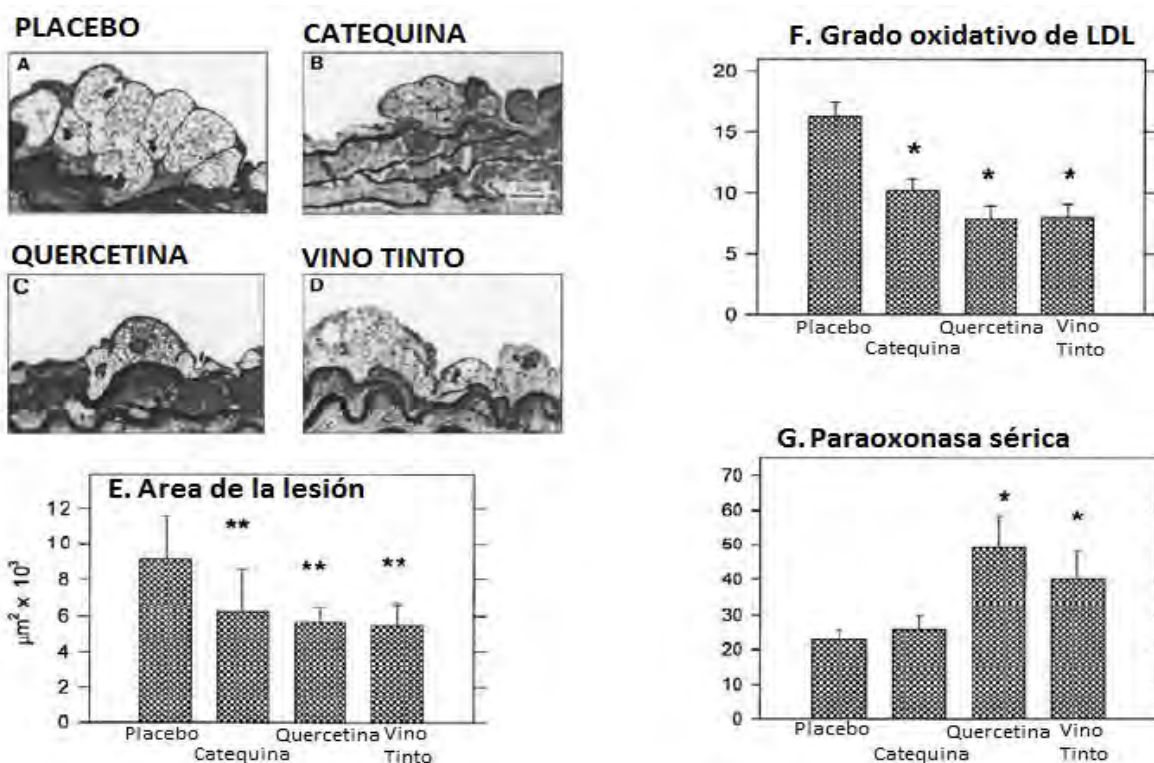
### **2.2.7 Efectos sobre presión sanguínea**

El resultado de investigaciones sobre modelos animales acerca de los efectos sobre la presión sanguínea de algunos flavonoides provenientes del té, muestran resultados inconsistentes. Estudios poblacionales a largo plazo sugieren que la ingesta regular de té puede normalizar la presión sanguínea en sujetos con presión elevada.<sup>124</sup> Sin embargo también existen reportes en los que se reporta que la ingesta de tés ricos en flavonoides pueden incrementar la presión arterial en un estudio realizado a seres humanos.<sup>125</sup> Así como también existen reportes en los que el consumo de chocolate negro rico en flavonoides no tienen ningún efecto sobre la presión sanguínea.<sup>126</sup>

### **2.2.8 Paradoja Francesa**

En este sentido, podemos hablar de un caso particular, que es el ejemplo tal vez más claro y famoso de la relación que existe entre el consumo de

polifenoles de origen natural y la mejora en la condición cardíaca. Este caso es conocido como la "Paradoja Francesa", que es una reducción significativa de la incidencia de enfermedad arterial coronaria a pesar de una dieta elevada en grasas, poco ejercicio y la incidencia del hábito de fumar (**Fig.13**). En un principio este fenómeno fue atribuido a una alta ingesta de alcohol y en el caso de Francia al consumo de vino tinto. Posteriormente se descubrió que los flavonoides podían jugar un papel central en la explicación de este efecto. En este contexto, el vino tinto, chocolate y el té verde y negro recibieron mucha atención, porque estos son particularmente ricos en flavonoides, e investigaciones epidemiológicas soportan la hipótesis que el consumo regular de flavonoides contenidos en los alimentos pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares.<sup>127</sup>



**Fig.13.** Disminución de aterosclerosis por consumo de vino. El consumo de vino tinto y sus flavonoides catequina y quercetina en ratones, disminuyó el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (A-E). (F) LDL fue aislada de ratones que consumieron placebo, vino tinto (0.5 mL/día por ratón), catequina o

quercetina (50 µg/día por ratón) durante un periodo de 6 semanas.) el grado oxidativo fue determinado como niveles de peróxido en lípidos de LDL (100 µg de proteína/mL). (G) Actividad de paraoxonasa fue medida como actividad de arilesterasa sérica derivada de ratones que consumieron placebo, catequina, quercetina, o vino tinto por seis semanas.<sup>127</sup>

En la Fig.13 se muestra que catequina y sobre todo quercetina pueden ejercer el mismo efecto anti-aterosclerótico que el vino tinto, lo que confirma que los flavonoides son los principales causantes del efecto cardioprotector de ciertos alimentos ricos en polifenoles.

En la **Fig.13 (G)** también se muestra que el vino tinto y la quercetina son capaces de elevar significativamente la concentración de paraoxonasa sérica (PON). La PON es una esterasa dependiente de calcio que se mantiene unida a las HDL. Esta capacidad del vino tinto y quercetina de elevar la concentración de la enzima PON es importante puesto que la PON le confiere propiedades antioxidantes a las HDL, además de proteger a las LDL de la oxidación. El mecanismo propuesto que explica las propiedades antioxidantes y antiaterogénicas de la PON es que esta enzima cataliza la conversión de lipoperóxidos proaterogénicos a los correspondientes lipohidróxidos que son biológicamente inocuos.<sup>128,129</sup>

### 2.2.9 Paraoxonasa, demencia vascular y Alzheimer

La actividad de la PON sérica disminuye con la edad y en enfermedades asociadas con un alto riesgo de eventos cardiovasculares adversos. En recientes investigaciones, la implicación de los factores vasculares en la demencia tipo Alzheimer está documentada.<sup>131</sup> Un estudio indica que la aterosclerosis de las arterias cerebrales puede estar asociada con la severidad de la angiopatía amiloide.<sup>132</sup> Por lo tanto, un mecanismo patológico relacionado con el metabolismo de los lípidos puede contribuir tanto al desarrollo de aterosclerosis y a la angiopatía amiloide cerebral. Ya que existen

investigaciones en los que se detectan cambios en la actividad de la PON en pacientes con alzheimer.<sup>133</sup> En este sentido existen investigaciones recientes en las que se utiliza el té verde, 1.5 l/día, rico en EGCG (catequina antioxidante) en pacientes con amiloidosis para atenuar algunos de sus síntomas.<sup>134,135</sup> Otros experimentos indican que algunos flavonoides, como cianidina, epicatequina y kaempferol son capaces de proteger a las neuronas contra el estrés oxidativo provocado por LDL-oxidadas de una manera más eficientemente que el ascorbato, aun cuando este se probó a concentraciones diez veces más alta. Sin embargo en este estudio también se muestra que otros flavonoides como quercetina y EGCG pueden tener un efecto neurotóxico.<sup>136</sup>

### 2.3 PROPIEDADES ANTICANCEROSAS

Actualmente el campo de estudio más relevante realizado con flavonoides es acerca de su importancia terapéutica sobre el conjunto de enfermedades humanas denominada cáncer. Sobre el cáncer sabemos que la frecuencia de casos se incrementa con el aumento de edad, por ejemplo, el 60% de muertes de cáncer se ubican entre personas de entre 55 y 64 años, pero solo el 10% de los casos se encuentran entre personas menores de 35 años (según la Organización Mundial de la Salud).

Los resultados experimentales que sugieren la posible actividad anticancerígena de diversos compuestos naturales, unido a la estimación de que más del 70% de los cánceres pueden deberse a la dieta, ha generado un creciente interés en los estudios epidemiológicos que examinan la relación entre los alimentos y la incidencia del cáncer. Debido a esto se ha generado el término "quimopreención," el cual es referido al uso de sustancias naturales y sintéticas o su combinación para bloquear, retardar, o revertir el desarrollo y progresión de carcinogénesis.

El interés por el estudio de los polifenoles como compuestos anticancerosos, no radica únicamente en el hecho que sean potentes antioxidantes, si no también, porque que actúan a distintos niveles de la oncogénesis y progresión tumoral. Por lo que los flavonoides presentan características singulares que los han hecho atractivos en el desarrollo de nuevos agentes antitumorales.

Los flavonoides han demostrado poseer propiedades antitumorales *in vitro* (Tabla.6), y existen evidencias que indican que lo mismo podría *ocurrir in vivo*. Sin embargo también existen reportes recientes en los que se demuestra la acción *in vivo* de diferentes flavonoides, y que ya tienen un uso comercial como es el caso de fenoxodiol y flavopiridol que se verán de manera particular en esta misma sección.

TIPO DE CÁNCER	LÍNEA CELULAR	FLAVONOIDE	REF.
Cáncer Oral	HSC-2,HSG,SCC-25	Flavonas, isoflavonas, EGC, chalconas, cúrcumina, genisteína, quercetina	137-141
Mama	MCF-7	Flavanonas, daidzeína, genisteína, quercetina, luteolina	142-143
Tiroides	ARO, NPA, WRO	Genisteina, apigenina, kaempferol, luteolina	144-145
Pulmón	SKLUI, SW900, H441, H661, A549	Flavona, quercetina	146-147
Próstata	LNCaP,PC3, DU145	Catequinas, epicatequina, quercetina, kaempferol, luteolina, genisteína, apigenina, miricetina, silimarina	148-151
Colon	Caco-2, HT-29, IEC-6, HCT-15	Flavona, quercetina, genisteína, antocianinas	152-156
Leucemia	HL-60, K562, JURKAT	Apigenina, quercetina, miricetina, chalconas	157-160

**Tabla 6.** Acción anticancerígena *in vitro* de diferentes flavonoides

Los flavonoides muestran una gran gama de efectos celulares y de ejercer diferentes mecanismos de acción, tales como inhibición del ciclo celular, inducción de apoptosis, inhibición del factor nuclear kappaB (NF-κB), de topoisomerasas I/II, así como de quinasas, liberación de citocromo c para la subsecuente activación de caspasas 3 y 9 (las cuales son promotoras de apoptosis), además de ejercer propiedades oxidantes o antioxidantes.

Los flavonoides presentan características que los han hecho atractivos para la investigación anticancerígena. Interfieren *in vitro* y por distintos mecanismos en el proceso oncogénico, lo que los hace posibles agentes de utilidad en las primeras fases del cáncer o en la inhibición de las etapas posteriores de progresión o invasión.

### 2.3.1 Actividad antioxidante y carcinogénesis

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) que incluyen a los radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxilo ( $LOO^{\cdot}$ ), hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), oxígeno singlete ( $O_2$ ) y óxido nítrico (NO), además del ion peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), son consideradas moléculas importantes por jugar un rol importante en el desarrollo y progresión del deterioro celular.<sup>162-165</sup>

Las ERO pueden estimular la proliferación celular, promover la inestabilidad genética y promover que las células cancerígenas mantengan sus fenotipos malignos.<sup>166,167</sup> Dentro de las ROS, el radical hidroxilo puede alterar muy severamente mediante la oxidación a toda clase de moléculas como lípidos celulares, proteínas y DNA, además de alterar la transducción de señales.<sup>168</sup>

En general las ERO poseen una alta capacidad de carcinogénesis por los siguientes efectos: (a) causan cambios estructurales permanentes en ADN, mutaciones sobre los pares de bases; (b) iniciación de peroxidación lipídica; (c) activar rutas de transducción de señales citoplasmáticas y nucleares; y (d)



modular la actividad de proteínas y genes relacionadas con estrés que regulan genes relacionados con el crecimiento, diferenciación y muerte celular.<sup>166,168-170</sup> Por lo que reducir el estrés oxidativo es una estrategia de la quimoprevención.<sup>171</sup>

Estudios epidemiológicos indican que la dieta rica en antioxidantes es capaz de disminuir el riesgo de cáncer de próstata,<sup>172</sup> páncreas,<sup>173</sup> ceno,<sup>174,175</sup> pulmón<sup>176</sup> y colon.<sup>177</sup> Como ejemplo tenemos al flavonol quercetina que incrementa los niveles de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa) y disminuye niveles de hidroperóxido lipídico debido al estrés oxidativo inducido en ratas.<sup>178</sup>

### 2.3.1.1 Mecanismo Prooxidante

Alternativamente algunos compuestos anticancerígenos generan ROS los cuales son capaces de detonar la muerte celular programada (apoptosis), a pesar de los daños al ADN que pueden causar los mismos ROS, interesantemente estos agentes pueden actuar solo en células tumorales y no en células normales.<sup>179</sup> Por ejemplo el ácido gálico presenta capacidad citotóxica frente a células de cáncer prostático DU145 a través de la generación de ROS.<sup>180</sup>

Li et al.<sup>181</sup> observaron la elevación intracelular de ROS durante la inducción de apoptosis, causada por EGCG en células de hepatocarcinoma SMMC7721. EGCG (Epigallocatequina-3-galato) induce la apoptosis, no la inhibición del crecimiento tumoral.<sup>182</sup> De hecho, cuando se añadió EGCG a los cultivos celulares (ej. células HT29 en Medio McCoy 5A), se observó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>183</sup> Lo que sugiere que la generación de radicales libres puede redetonar el mecanismo apoptótico por vías no endógenas.

### 2.3.2 Regulación de apoptosis

Apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico involucrado en el mantenimiento de organismos multicelulares y juega un papel importante en el desarrollo y muerte celular.<sup>184</sup>

Compuestos naturales tales como los flavonoides parecen exhibir sus funciones anticancerígenas a través de la inducción de la apoptosis, como ha sido demostrado en sistemas celulares, sin embargo el mecanismo exacto de estas acciones no ha sido totalmente entendido.<sup>185,186</sup> Por ejemplo EGCG es capaz de inducir apoptosis en las primeras etapas del cáncer de próstata a través de la regulación negativa del factor de crecimiento IGF-1 (promotor de angiogénesis) y la modulación de biomarcadores inflamatorios.<sup>187</sup> También las proantocianidinas que se encuentran disponibles en varias partes de las plantas y frutas tales como moras, uvas y específicamente en las semillas de las uvas, se les ha relacionado con promoción de apoptosis, ya que extractos de las semillas de uvas pueden proteger a las células cardíacas contra de la apoptosis vía la inducción de enzimas antioxidantes endógenas.<sup>188</sup> Este hecho es importante debido a la existencia de estudios en los que se indica que la apoptosis ocurre en el corazón humano durante la etapa final de la falla cardíaca o en infarto al miocardio agudo, lo cual sugiere que el proceso apoptótico está implicado en la enfermedad cardiovascular.<sup>189</sup>

También las procianidinas derivadas de manzanas inducen apoptosis mediada por caspasas en adenocarcinoma de esófago, así como también es capaz de anclar el ciclo celular en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>,<sup>190</sup> lo cual es un factor importante para inhibir el crecimiento celular acelerado. La flavona apigenina induce la muerte celular apoptótica relacionada con las rutas apoptóticas intrínsecas y extrínsecas.<sup>191,192</sup> También se reporta que apigenina, crisina y luteolina tienen un rol específico en la apoptosis mediante la inhibición de la ruta ubiquitina-

proteosoma, la cual tiene un rol importante en la regulación de la apoptosis y en el ciclo celular.<sup>193</sup>

### 2.3.3 Regularización del ciclo celular

La alteración del funcionamiento del ciclo celular es una característica básica de las células tumorales. El desarrollo de cáncer está asociado con desordenes en la regulación del ciclo celular. El desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos se enfocan principalmente en su capacidad para aletargar el ciclo celular.<sup>194</sup> Recientemente se ha descrito la capacidad de ciertos flavonoides como la genisteína, un isoflavonoide abundante en la soya y comúnmente consumido en Asia, de regular epigenéticamente el ciclo celular ya que se reporta la capacidad de activar apoptosis mediante las rutas de control de daño de DNA ATM-Chk2-Cdc25 y ATR-Chk1-Cdc25, y detener a las células de cáncer de ovario HO-8919 en la fase G2/M del ciclo celular.<sup>195</sup> Proantocianidinas, compuestos encontrados en altas concentraciones en frutas como arándanos, moras y extractos de uvas, no solo son capaces de inducir apoptosis mediante la detonación de reguladores apoptóticos, sino que además inhiben la proliferación celular mediante la inhibición del ciclo celular en células de cáncer oral.<sup>196</sup> También Kaur M. *et al.*<sup>197</sup> reportaron que el extracto de semillas de uvas induce el paro del ciclo celular en células humanas de carcinoma de colon. Además EGCG bloqueó la progresión del ciclo celular en fase G1 en células de carcinoma HepG2.<sup>198</sup>

Un estudio reciente mostró que las flavonas (luteolina, apigenina, y crisina) y los flavonoles (quercetina, kaempferol, y miricetina) fueron capaces de inducir citotoxicidad en células de carcinoma de esófago (KYSE-510) de una manera dosis-tiempo-dependiente mediada por la suspensión del ciclo celular en la fase G2/M, la potencia de los compuestos estudiados fue; luteolina>quercetina>crisina>kaempferol>apigenina>miricetina.<sup>199</sup>

### 2.3.4 Inhibición de angiogénesis

Angiogénesis es el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en la existente vasculatura, de manera que propicia el crecimiento y diseminación tumoral mediante el abastecimiento de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento.<sup>200</sup> Se ha encontrado que varios flavonoides, como EGCG y genisteína, son capaces de atenuar angiogénesis en muchos tipos de cánceres.<sup>201,203-207</sup> También se ha reportado la capacidad de las proantocianidinas de las semillas de uvas para inhibir el cáncer de pulmón *in vivo*.<sup>202</sup> Y por su parte diferentes compuestos anti-angiogénicos han demostrado ser activos contra el desarrollo de cáncer en ensayos clínicos.<sup>208</sup>

El flavonol del té EGCG inhibe la invasión y migración de células de carcinoma de glándula salival.<sup>209</sup> Fang *et al.*<sup>210</sup> demostraron que la flavona apigenina inhibió la angiogénesis tumoral *in vivo*. El extracto de semillas de uva también se mostró efectivo en inhibir la angiogénesis en células MDA-MB-231 de cáncer de seno en ratas.<sup>211</sup>

### 2.3.5 Regulación de las rutas celulares de transducción de señales

La cascada de señalización celular es mediada por diferentes factores nucleares como Nrf2, NF-κB, activador proteico (AP-1), proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK), y ciclooxigenasa-II (COX-2), los cuales se consideran que juegan un papel central en la iniciación tumoral, promoción y progresión, por lo que son objetivos moleculares promisorios en el diseño de drogas hacia la prevención y terapia del cáncer.<sup>212</sup>

#### 2.3.5.1 Regulación de NF-κB

La regulación defectuosa de la proteína NF-κB está relacionada con cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, shock séptico, infecciones virales

o un desarrollo inmune inadecuado. También está implicado en procesos de plasticidad sináptica y de memoria. Debido a que NF- $\kappa$ B está relacionado a inflamación y carcinogénesis, su modulación se considera como un objetivo importante en el diseño de quimoprotectores.<sup>213</sup>

Se ha descrito que la activación sostenida de NF- $\kappa$ B en el hígado es característica del hepatocarcinoma celular,<sup>214</sup> ya que promueve la expresión de los miembros antiapoptóticos de la familia de genes bcl-2 y de los inhibidores de caspasas.<sup>215,216</sup>

La modulación de varios objetivos moleculares, como NF- $\kappa$ B, proteína quinasas activadas por mitógenos, y PI3K/Akt por proantocianidinas *in vitro* y *in vivo* en modelos tumorales sugiere la importancia sobre el mecanismo de acción para la prevención de cánceres de diferentes órganos.<sup>217</sup> En este sentido el flavanol EGCG (epigallocatequina galato) inhibe MAPK (proteína quinasas activadas por mitógenos) el cual es un factor de crecimiento relacionado con señalización celular, AP-1 y NF- $\kappa$ B, topoisomerasa I, las metaloproteínas de matriz, y otros potenciales objetivos en múltiples células cancerígenas. Katula *et al.*<sup>214</sup> sugieren que los flavonoides, EGCG, genisteína y quercetina modulan la actividad de NF- $\kappa$ B en función de la concentración.

Hämäläinen M. *et al.*,<sup>61</sup> reportaron un estudio donde se comparó el efecto de 36 flavonoides y otros compuestos fenólicos sobre la producción de NO y expresión de iNOS en macrófagos activados por un polisacárido de origen bacteriano. En este estudio se reportó que los flavonoides genisteína, kaempferol, quercetina y daidzeína, inhibieron la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT-1 (factores de transcripción para la síntesis de iNOS), mientras que los flavonoides naringenina, flavona, isorhamnetina y pelargonidina inhibieron solamente a NF- $\kappa$ B. Estos resultados explican

parcialmente la relación entre los efectos anticancerígenos y antiinflamatorios de algunos flavonoides.

### 2.3.5.2 Regulación de Proteína C reactiva, COX-2, iNOS e inflamación

La Proteína C reactiva (PCR ó CRP por sus siglas en inglés) es una proteína plasmática circulante, que aumenta sus niveles en respuesta a la inflamación (proteína de fase aguda). La PCR es un marcador general para la inflamación y la infección, por ello, puede ser usada para determinar el riesgo de estar padeciendo un infarto agudo de miocardio.<sup>219</sup>

Por otro lado la prostaglandina-endoperóxido sintasa 2, también conocida como PTGS2 o COX-2, es una proteína codificada en humanos por el gen *ptgs2*. La ciclooxigenasa COX-2 es una enzima clave en la biosíntesis de prostanoides (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos), los cuales juegan un papel central en la respuesta inflamatoria.<sup>220</sup> La biosíntesis de prostaglandinas y de óxido nítrico está relacionada en el proceso inflamatorio, debido a que las isoformas inducibles iNOS y COX-2 son responsables por la gran producción de sus mediadores pro-inflamatorios.

Ha sido demostrado que los flavonoides son capaces de inhibir la expresión de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) y la ruta celular de transducción de señales de lipooxigenasa, los cuales son responsables de la producción de óxido nítrico, prostanoides y leucotrieno.<sup>221</sup>

Victoria García-Mediavilla, et al.<sup>100</sup> reportaron la capacidad de los flavonoles quercetina y en particular de kaempferol de inhibir la síntesis de iNOS. Se encontró que el flavonol kaempferol presentó la mayor capacidad de inhibición de la expresión de COX-2, de PCR y también de NF-κB de una manera dependiente de la concentración entre un rango de 5-200 μM en células hepáticas. En relación con cáncer, también se reporta que kaempferol pero no

quercetina suprime varias rutas de señalización mediadas por tirosina quinasa en células de cáncer de próstata.<sup>222</sup>

### 2.3.6 La alimentación como factor preventivo de cáncer

Una ingesta elevada de frutas y hortalizas ricas en polifenoles (PFs) parece asociarse a la disminución de la incidencia de los cánceres humanos más frecuentes: pulmón, colón, próstata y mama.<sup>223</sup> Además de los datos epidemiológicos, existen numerosos estudios de laboratorio, fundamentalmente *in vitro*, donde se demuestran efectos anticancerígenos potenciales de los PFs naturales.

Un ejemplo lo tenemos en el té y sus derivados, que han demostrado efectos anti-carcinogénicos, en distintos órganos como la piel, los pulmones, la cavidad oral, el esófago, el estómago, el hígado, el páncreas, el intestino delgado, el colon y la próstata.<sup>224,225</sup> Esta actividad anticarcinogénica es común a otros PFs, como la cúrcumina, ácido elágico y taxol.

Por otra lado se reporta que el género *Citrus* es de gran interés para la investigación oncológica, ya que se ha encontrado que diferentes flavonoides *O*-metilados, abundantes en los cítricos, presentan gran capacidad de interferir en los procesos de oncogénesis.<sup>226</sup> Las frutas de esta familia contienen altas concentraciones de varias clases de fenoles, incluyendo numerosos hidroxicinamatos, glicósidos de flavonoides y flavonas polimetoxiladas. Este último grupo, que se presenta sin enlaces glucosídicos, ha mostrado la capacidad de inhibir la proliferación de un cierto número de células cancerígenas, como el caso de Nobiletina (flavonoide polimetoxilado), el cual ha mostrado ser un potente anti-angiogénico tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.<sup>227</sup>

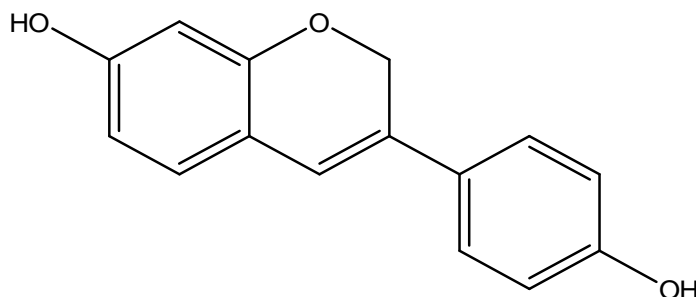
### 2.3.7 Compuestos anticancerígenos de uso comercial

Toda la investigación que se ha hecho durante años en el campo de los flavonoides ha logrado producir algunos compuestos anticancerígenos con la suficiente potencia como para ser aprovechados comercialmente.

#### 2.3.7.1 Fenoxodiol

El fenoxodiol (**Fig.14**) fue desarrollado en EE.UU. por la compañía oncológica Marshall Edwards, Inc. como una terapia novedosa en combinación con el carboplatino para el tratamiento de los cánceres de ovario quimio-resistentes en sus últimas etapas, así como una monoterapia para los cánceres cervicales y de próstata.

El fenoxodiol pertenece al tipo de medicamentos llamados inhibidores de la transducción de señales, inhibiendo las rutas de comunicación clave que sobreviven dentro de las células cancerígenas, causando la muerte selectiva de dichas células y una mayor susceptibilidad a medicamentos como el platino y el taxano, a los que la mayoría de pacientes de cáncer de ovario se vuelven resistentes en la última etapa de la enfermedad. Esta es una enfermedad que se estima que mata a más de 15,000 mujeres este año en los EE.UU. solamente.<sup>228</sup>



**Fig.14.**Fenoxodiol

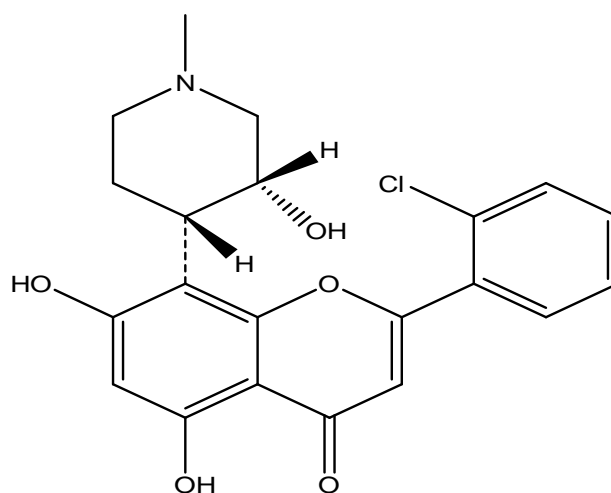


En Febrero de 2012 se reportó un estudio multinacional, el Ovarian Tumor Response (OVATURE), en más de 60 centros de todo el mundo. Este estudio clínico multicentro de Fase III y multinacional informó sobre los efectos del fenoxodiol en mujeres con cáncer de ovario avanzado resistente o refractario a los medicamentos basados en platino. En este estudio se determinó su seguridad y efectividad cuando se combina con el carboplatino.<sup>229</sup>

También se reporta que nuevos medicamentos de segunda generación derivados de fenoxodiol, como el ME-143 presentan mayor capacidad antitumoral *in vivo* que fenoxodiol y que además es capaz de sinergizar con carboplatino, este estudio aun se encuentra en fase I.<sup>230</sup>

### 2.3.7.2 Flavopiridol

Flavopiridol (**Fig.15**) es una flavona de origen sintético que actualmente está en estudio utilizada para el tratamiento de varios tipos de cáncer



**Fig.15.** Flavopiridol (Alvocidib)

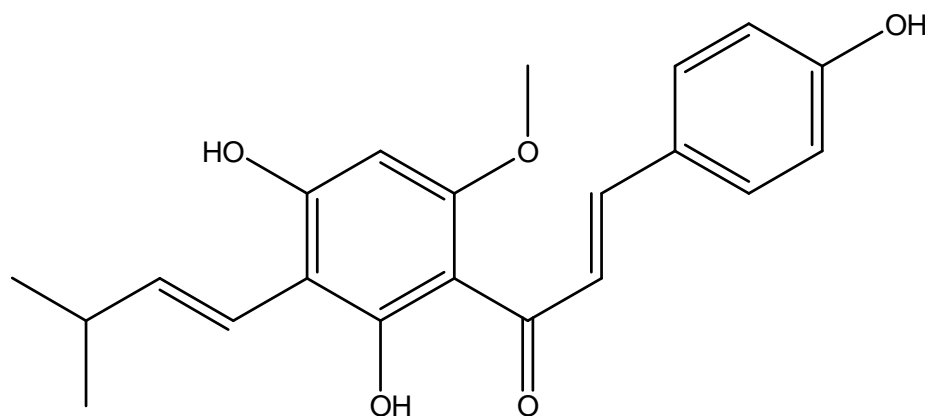
En 1999 se reportó como el primer inhibidor de las CDK (ciclina dependientes de quinasas) en estudios clínicos, con clara capacidad de bloquear la

progresión del ciclo celular en G1/S y G2/M, lo que impide que las células tumorales se multipliquen y con esto destruir las células cancerosas. Más aun, estudios preclínicos mostraron la capacidad de flavopiridol para inducir muerte celular programada, inhibir el proceso angiogénico y modular procesos transcripcionales. Por lo que se ha utilizado como un agente antitumor en varios tipos de linfomas como leucemia y cánceres como hígado y pulmón.<sup>231</sup>

En un estudio realizado por Sato y Shinsuke<sup>232</sup> se evaluó este compuesto por su habilidad para suprimir el crecimiento tumoral de cáncer esofágico en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID). En este estudio se mostró que un tratamiento de 10mg/Kg reduce el volumen del tumor significativamente.

### 2.3.7.3 Xantohumol

Xantohumol es una prenil-chalcona encontrada principalmente en el bulbo de lúpulo (*Humulus lupulus*) y en menor cantidad en cerveza (**Fig.16**).



**Fig.16.** Xantohumol

Albini *et al.*<sup>233</sup> mostraron que xantohumol es un potente preventivo de la angiogénesis cuyos mecanismos de acción se enfocan en la migración celular, invasión y proliferación. Xantohumol parece afectar de manera importante

diferentes rutas que conducen a una inhibición eficiente de la angiogénesis *in vivo*. Ya que reportan que en estudios ELISA, el xantohumol reduce la cantidad de NF-kB activo en células de Sarcoma de Kaposi estimuladas por el factor de necrosis tumoral (TNF).

De manera reciente Benelli R. *et al.*<sup>234</sup> demostraron que xantohumol inhibe el crecimiento celular, induce apoptosis y reduce invasión celular en ratones con leucemia linfocítica. Concluyeron que xantohumol disminuye la actividad de las vías FAK/AKT/NF-kB, así como la modulación de genes que contribuyen al control de estos efectos.

## 2.4 EFECTOS ANTIMICROBIANOS DE LOS FLAVONOIDES

Los productos naturales han sido una fuente particularmente una rica fuente de compuestos antimicrobianos, por ejemplo las penicilinas en 1940, las tetraciclinas en 1948 y los glicopéptidos en 1955. Sin embargo la resistencia a agentes antimicrobianos se ha convertido en un problema creciente dentro del ámbito de la salud pública. Según datos de la sociedad americana de enfermedades infecciosas de los Estados Unidos (IDSA), de las dos millones de personas que adquieren infecciones bacteriales cada año, 70% de los casos están relacionados con cepas que son resistentes a al menos un fármaco.<sup>235</sup> Como ejemplo, la resistencia a metaciclina de la bacteria *Staphylococcus aureus* es un caso que amenaza a la salud pública del Reino Unido, donde se ha cuantificado que el 50% de las cepas de *S.aureus* son quimioresistentes a metaciclina.<sup>236</sup> Por esta razón es necesario desarrollar continuamente nuevos antibióticos para el sector público con los cuales se pueda hacer frente a la quimio-resistencia bacteriana.

Un gran número de flavonoides han demostrado tener propiedades antivirales, antifúngicas y antibacterianas. Por cientos de años, médicos y sanadores empíricos han usado preparaciones las cuales contienen constituyentes

fisiológicamente activos en intentos para sanar diferentes padecimientos humanos.<sup>237</sup> Por ejemplo, la planta *Tagetes minuta* que contiene quercetagetina-7-arabinosyl-galactosido, ha sido ampliamente usado por la medicina tradicional argentina en el tratamiento de enfermedades infecciosas.<sup>238</sup>

De la misma manera, las propiedades antimicrobianas del propoleo han sido referidas por el viejo testamento,<sup>239</sup> y también fueron mencionadas por Hipócrates en la antigua Grecia para el tratamiento de dolores y úlceras.<sup>240</sup> Las propiedades del propoleo han sido atribuidas a su alto contenido de flavonoides y en particular a la presencia de los flavonoides de galangina y pinocembrina.<sup>241-243</sup>

#### 2.4.1 Actividad antibacterial

Actualmente la actividad antibacterial de diferentes flavonoides ha sido ampliamente reportada. Los extractos crudos de plantas con un historial de uso como remedio tradicional han sido blancos de estudio *in vitro* por muchos grupos de investigación por su actividad antibacterial. Extractos de plantas ricos en flavonoides provenientes de *Hypericum*,<sup>244</sup> *Capsella*,<sup>245</sup> y *Chromolaena*<sup>245</sup> han sido reportados por poseer actividad antibacterial.

Muchos grupos de investigación han ido un paso más allá y han aislado e identificado la estructura de diferentes flavonoides que poseen actividad antibacterial, a su vez también se han cuantificado la actividad de flavonoides disponibles en la dieta. Ejemplo de esto son apigenina,<sup>246-247</sup> galangina,<sup>248</sup> pinocembrina.<sup>249</sup>

También existen estudios realizados, como los realizados por Vijaya y Ananthan,<sup>250</sup> quienes administraron de manera oral los flavonoles quercetina(142.9mg/Kg) o quercetrina (214.3mg/Kg), los cuales protegieron a

puercos de guinea infectados con *Shigella*, la cual mató a un grupo control de dichos animales. También Dastidar *et al.*<sup>251</sup> reportaron que la inyección intraperitoneal de soforaisoflavona A (1.58mg/Kg) o de 6,8-diprenilgenisteina (3.16mg/Kg) dieron protección significativa a ratones infectados con  $9.5 \times 10^8$  UFC de *Salmonella typhimurium*.

#### 2.4.1.1 Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos

En un estudio usando precursores radioactivos Mori *et al.*<sup>252</sup> mostraron que la síntesis de DNA es fuertemente inhibida por los flavonoides robinetina, miricetina y (-)-epigallocatequina en *S.aureus*. Mientras que la síntesis de proteínas y lípidos fue inhibida pero con menor intensidad. Los autores también sugieren que el anillo B de los flavonoides juega un papel importante en la intercalación de enlaces de hidrogeno en el ensamblaje de las bases de ácidos nucleicos.<sup>253</sup>

Por otro lado Ohemeng *et al.* analizaron 14 flavonoides estructuralmente diversos, para medir su capacidad de inhibición de la actividad de ADN girasa en *Escherichia coli*, y por la actividad antibacterial contra *Staphylococcus epidermidis*, *S.aureus*, *E.coli*, *S.typhimurium* y *Stenotrophomonas maltophilia*.<sup>246</sup> Encontraron que la ADN girasa de *E.coli* fue inhibida por siete de los compuestos estudiados, incluidos quercetina, apigenina y 3,6,7,3',4'-pentahidroxi-flavona. Interesantemente, con la excepción de 7,8-dihidroxi-flavona, la inhibición enzimática fue producida por los compuestos hidroxilados en el anillo B.

Sin embargo también reportan que la actividad antibacterial y la actividad inhibitoria de la ADN girasa no siempre se correlacionan, por lo que sugieren que existen otros mecanismos involucrados. Como la alteración de las propiedades de la membrana citoplasmática, a través de modificar la permeabilidad de la membrana como es el caso de quercetina y el propóleo.<sup>254</sup>

### 2.4.2 Estudio de actividad antiparasitaria

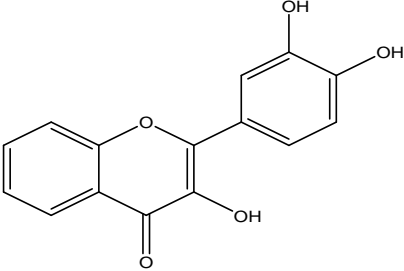
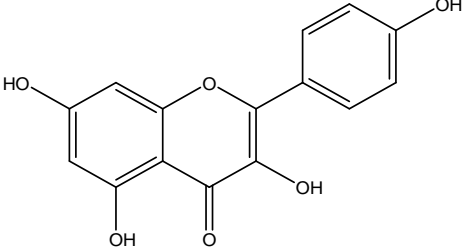
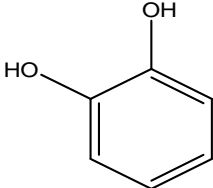
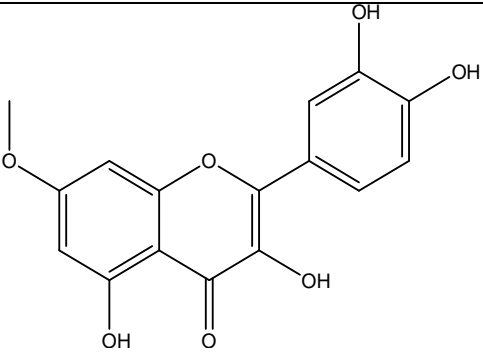
Un estudio realizado en la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN (ENMH-IPN) evaluó la actividad de algunos flavonoides como agentes antiprotozoarios contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* a partir de plantas medicinales y de fuentes nutricionales (**Tabla 7.**)<sup>255</sup> El estudio demostró que el flavan-3-ol (epicatequina) fue el compuesto más potente contra ambos protozoarios, con  $CI_{50}$  de 1.92 g/mL contra *E.histolytica* y de 1.64 g/mL contra *G.lamblia*. En esta participación se mostraron en detalle los resultados obtenidos en el estudio fitoquímico biodirigido de la especie *Cuphea pinetorum* y de relación estructura química actividad antiprotozoaria de flavonoides de origen natural.

También, galangina, un flavonol comúnmente encontrado en muestras de propoleo, ha mostrado actividad inhibitoria contra *Aspergillus tamarii*, *A.Flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*.<sup>256</sup>

#### 2.4.2.1 Flavonoides contra *Plasmodium*

La malaria es una enfermedad potencialmente mortal ocasionada por la infección con el parásito *Plasmodium falciparum*, el cual se transmite a los seres humanos por medio de las picaduras de los mosquitos del género *Anopheles* infectados con el parásito. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la malaria está presente en más de 100 países. Cada año hay alrededor de 30 millones de casos de malaria y más de 1 millón de personas muere por esta enfermedad.<sup>257</sup> En nuestros días, la incidencia de la malaria ha ido incrementándose debido a hábitos higiénicos deficientes, variación en las condiciones climáticas, entre otros factores. Un factor importante en la incidencia de la malaria es el alto nivel de resistencia de

*P.falciparum* a casi todas las drogas antimaláricos disponibles (cloroquina, atovaquona, etc.).<sup>258</sup>

Compuesto (Familia química)	Estructura	Protozooario al que afecta	Dosis
Fisetina (Flavonol)		<i>Leishmania sp.</i>	CI <sub>50</sub> =0.6 µg/ml
Kaempferol (Flavonol)		<i>E. histolytica</i> <i>G. lamblia</i>	CI <sub>50</sub> =7.9 µg/ml
Catecol. (polifenol)		<i>T. brucei</i>	CI <sub>50</sub> =0.8 µg/ml
Ramnetina (flavonol)		<i>T. brucei</i>	CI <sub>50</sub> =0.5 µg/ml

**Tabla 7.** Estructura y actividad de flavonoides antiparasitarios.<sup>255</sup>

Por otro lado existe evidencia de un gran número de flavonoides, tales como chalconas sintéticas así como algunas aisladas de *Dorstenia barteri* var. *Subtriangularis* que fueron evaluadas *in vitro* contra la cepa W2 de *P.falciparum*, de estas, se reporta que bartericina A, estipulina y 4-hidroxi-lonchocarpina mostraron actividad antimalárica a concentraciones inhibitorias al 50% (CI<sub>50</sub>) relativamente bajas (2.5, 5.1 y 3.4 μM, respectivamente), lo cual confirma a las chalconas como líderes potenciales para el desarrollo de nuevos antimaláricos.<sup>259</sup>

Adicionalmente un gran número de chalconas y sus derivados, fueron analizadas *in vitro* contra cepas de *P.falciparum* resistentes y sensibles a cloroquina (fármaco del grupo de las 4-aminoquinolinas usado en el tratamiento o prevención de la malaria) mostrando actividad en rangos nanomolares, siendo el más activo el derivado 1-(2,5-diclorofenil)-3-(4-quinolinil)-2-propen-1-ona, con una CI<sub>50</sub> de 200 nM.<sup>260</sup> También, y de manera más reciente se ha reportado que los flavonoides de origen dietario como quercetina, apigenina, luteolina y kaempferol muestran actividad antimalárica así como efectos sinérgicos contra cepas resistentes a cloroquina de *P.falciparum* *in vitro* en concentraciones entre 11-73 μM.<sup>261</sup> También recientemente se ha reportado la capacidad de EGCG de disminuir la adhesión del parásito *P.falciparum* a eritrocitos mediante la interacción con el ligando específico ICAM-1 en el tratamiento de malaria cerebral.<sup>262</sup>

#### 2.4.2.2 Flavonoides contra *Leishmania*

En un estudio enfocado a evaluar la actividad *in vitro* de 20 chalconas aisladas de plantas contra promastigotes extracelulares de los parásitos de *L.donovani*, *L.infantum*, *L.enrieti* y *L.major*, la mayoría de los compuestos fueron activos contra el parásito extracelular con CI<sub>50</sub> entre 0.07 y 2.01 μg/ml. Algunas chalconas tales como las 2',4'-dihidroxi-4-metoxichalcona, 2'-hidroxi-3,4-



dimetoxichalcona y 2-hidroxi-4,4'-dimetoxichalcona inhibieron la sobrevivencia intracelular de *L. donovani* con valores de  $CI_{50}$  entre 0.39 y 0.41  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>263</sup>

Por otro lado, flavonoides glicósidos también han sido reportados con actividad antileishmanial *in vitro*. Los más potentes fueron fisetina, 3-hidroxi flavona, luteolina y quercetina con valores de  $CI_{50}$  de 0.6, 0.7, 0.8 y 1.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, quercetina inhibió en un 15.3% la infección en ratones inoculados con *L. donovani*.<sup>264</sup> Otros investigadores encontraron que este tipo de flavonoides poseen la capacidad para estimular mecanismos de defensa en células infectadas con *Leishmania*, esencial en la proliferación y diferenciación de las células inmunes.<sup>265</sup>

#### 2.4.2.3 Flavonoides contra *Trypanosoma*

La tripanosomiasis africana, también conocida como enfermedad del sueño es causada por *Trypanosoma brucei*, y es fatal si no se trata con medicamentos. La enfermedad afecta principalmente a las poblaciones pobres que viven en áreas rurales remotas de África. Mientras que *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la tripanosomiasis americana, también conocida como enfermedad de chagas.<sup>266</sup>

Estudiando la actividad *in vitro* de un grupo de flavonoides agliconas y glicósidos contra *T. brucei rhodesiense* y *T. cruzi*, se encontraron que la mejor actividad contra *T. brucei rhodesiense* fue ejercida por 7,8-dihydroxi flavona con una  $CI_{50}$  de 68  $\text{ng/ml}$ , seguida por 3-hidroxi flavona, ramnetina, 7,8,3',4'-tetrahydroxi flavona ( $CI_{50}$ , 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) y catecol ( $CI_{50}$ , 0.8  $\mu\text{g/ml}$ ).<sup>264</sup>

Además se ha reportado la acción antitripanosomal de catequinas de *Camellia sinensis* contra dos diferentes estadios del desarrollo de *T. cruzi*, el tripomastigote no proliferativo y el amastigote intracelular replicativo.

Encontrándose que ocho de las catequinas estudiadas lisan más del 50% de los parásitos presentes en la sangre de ratones infectados a concentraciones tan bajas como 0.12 y 85 pM, siendo los compuestos más activos la galocatequina galato (GCG) y la epigalocatequina galato (EGCG). En este estudio el número de amastigotes en células infectadas disminuyó en 50% en presencia de cada uno de estos compuestos a concentraciones de 100 nM, además la actividad de la arginina cinasa, enzima clave en el metabolismo energético del parásito se inhibió en un 50% a concentraciones nanomolares de catequina galato (CG) y galocatequina galato (GCG), por lo que eventualmente estos compuestos pueden ser usados como agente terapéutico contra el mal de Chagas.<sup>267</sup>

Un estudio reciente de Nour *et al.*<sup>268</sup> muestra la capacidad del extracto de diclorometano de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae), así como de sus flavonoides polimetoxilados extraídos, para ejercer una prominente actividad antiparasitaria. Así mismo la actividad del extracto contra *Trypanosoma brucei rhodesiense* es  $IC_{50}=0.78 \mu\text{g/mL}$  y  $IC_{50}=3.4 \mu\text{g/mL}$  contra *Leishmania donovani*. Los flavonoides purificados también presentaron una actividad en el rango de  $\mu\text{g/mL}$  aunque menor a la actividad del extracto.

### 2.4.3 Actividad antifúngica

Debido a la capacidad de algunos flavonoides de inhibir la germinación de esporas de plantas patógenas, han sido valorados para su uso contra este tipo de patógenos presentes en el hombre.<sup>269</sup> Ejemplo de esto es una flavanona prenilada aislada del arbusto *Eysenhardtia texana* que ha sido identificada como 5,7,4'-trihidroxi-8-metil-6-(3-metil-[2-butenil])-(2S)-flavanona que ha mostrado poseer actividad contra el patógeno oportunista *Candida albicans*.<sup>270</sup> También el flavonoide 7-hidroxi-3',4'-(metilendioxi)flavano, aislado de la corteza de *Terminalia bellerica*, ha mostrado poseer actividad contra

*C. albicans*.<sup>271</sup> Aparte hay reportes de dos flavonoides aislados de *Artemisia giraldii* identificados como 6,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona y 5,5'-dihidroxi-8,2',4'-trimetoxiflavona, junto con 5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona han sido reportados por exhibir actividad contra *Aspergillus flavus*,<sup>272</sup> una especie de hongo que causa enfermedad invasiva en pacientes inmunodeprimidos.

Por otro lado la actividad del propoleo contra dermatofitos y *Candida* spp. ha sido parcialmente atribuida a su alto contenido de flavonoides,<sup>273</sup> como es el caso de galangina, un flavonol comúnmente encontrado en muestras de propoleo,<sup>237</sup> el cual ha mostrado tener actividad inhibitoria contra *Aspergillus tamarii*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*.<sup>254</sup>

#### 2.4.4 Actividad antiviral

Un área reciente de investigación que es de particular interés es la aparente actividad inhibitoria de algunos flavonoides contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Estudios *in vitro* han mostrado que baicalina (flavona extraída principalmente de *Scutellaria lateriflora*) inhibe la infección y replicación de la cepa HIV-1 mediante la inhibición de la entrada del virus a las células CD4,<sup>274</sup> así como mediante el antagonismo de la transcriptasa reversa de HIV-1.<sup>275</sup> Baicalein,<sup>276</sup> robustaflavona y hinokiflavona<sup>277</sup> así como varias catequinas presentan capacidad para inhibir la transcriptasa reversa, además de inhibir otras ADN polimerasas.<sup>278</sup> Otros reportes indican que varios flavonoides como gardenina A (no metilada), y 3,2'-dihydroxiflavona son capaces de inhibir a la proteasa del HIV-1.<sup>394</sup> Además también existen reportes que los flavonoides crisina, acacetina y apigenina previenen la activación de HIV-1 vía un novedoso mecanismo que probablemente involucra la inhibición de la transcripción viral.<sup>279</sup>

Conjuntamente con este estudio Hu *et al.* reportaron que la flavona crisina presentó los más altos niveles terapéuticos contra HIV-1 entre 31 flavonoides sintéticos y naturales.<sup>280</sup>

Recientemente Li *et al.*<sup>281</sup> describieron la capacidad del flavanol epigallocatequina galato (EGCG), la catequina más abundante del té verde, de inhibir la replicación de HIV-1 y HIV-2 a una concentración inhibitoria media de 1.6 y 2.0  $\mu\text{M}$  respectivamente. Los autores señalan que la replicación se inhibe en una etapa inicial donde se impide que el virus se integre en el ADN del huésped, sin embargo también se señala que el mecanismo exacto no está totalmente descrito. También reportan la inhibición sinérgica de EGCG con AZT (3'-azido-3'-deoxitimidina), el principal retroviral usado en el tratamiento de HIV.

Ciertos flavonoides también poseen actividad inhibitoria contra otros virus. Por ejemplo, Selway reporta que quercetina, morina, rutina, dihidroquercetina, dihidrofisetina, leucocianidina, cloruro de pelargonidina y catequina poseen actividad inhibitoria contra más de siete tipos de virus, incluidos el virus del herpes simple (VHS), virus sincial respiratorio (VSR), poliovirus y virus sindbis (SINV),<sup>282,283</sup> que es la causa más frecuente de bronquitis y neumonía en niños y bebés.

El mecanismo de acción propuesto incluye la inhibición de la polimerasa viral y además de acoplamiento a ácidos nucleicos o proteínas de la capsida.<sup>283</sup>

Además un estudio reciente describe la capacidad de las catequinas CG, EGCG, GCG Y ECG de reducir la actividad de la enzima integrasa del HIV-1, importante en el acoplamiento de la información del ARN viral dentro del ADN hospedero. Los autores reportan que las 4 catequinas estudiadas tienen un fuerte efecto sinérgico con una concentración inhibitoria media de  $\text{IC}_{50}=0.1 \mu\text{mol/L}$ .<sup>284</sup>

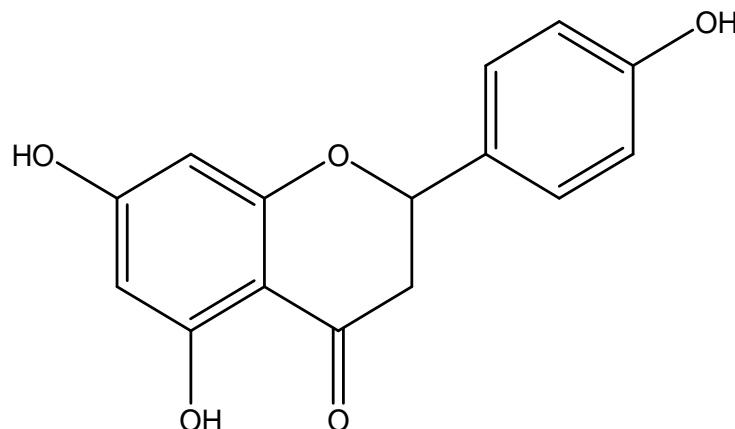
### 3. Casos particulares

Hasta este punto se ha hecho una revisión de las principales propiedades farmacológicas de los flavonoides, se han agrupado por sus propiedades antioxidantes, cardiotónicas, antimicrobianas y anticancerígenas. Sin embargo también es necesario conocer las propiedades de algunos flavonoides en particular y conocer sus propiedades de manera aislada. Por lo que en esta sección se describen las principales propiedades, primero de dos de los principales flavonoides presentes en la dieta humana, tal es el caso de naringenina y de quercetina los cuales son dos de los flavonoides más estudiados. También se presentan los casos de otros flavonoides naturales y/o semisintéticos que pese a no ser relevantes en la dieta humana, se han convertido en relevantes por sus notables propiedades hacia la investigación farmacológica.

#### 3.1 Naringenina

La naringenina se clasifica dentro de la familia de las flavanonas (**Fig.17**), siendo esta una de las familias más simple desde el punto de vista estructural, (solo después de la familia de las chalconas). Debido a esto se encuentra bien distribuida en un gran número de familias vegetales, siendo la más abundante en la familia de los cítricos. La naringenina y la naringina (su glucósido), son flavanonas encontradas en limones, tangerinas limas, naranjas, así como en toronjas tanto blancas como rosas, siendo esta última la mayor fuente de naringenina (naringenin-7-neohesperosido: 70%; narirutin: 20%),<sup>285</sup> mientras que se estima que la cantidad de naringenina es de 20-50 mg/100ml de jugo de toronja.<sup>286</sup>

Desde hace mucho tiempo ha sido reportado que naringenina y naringina poseen propiedades antivirales, así como agente en la disminución de colesterol en sangre y anticancerígenas.



**Fig.17.** Naringenina; 5,7,4'-trihidroxi-flavanona ( $C_{15}H_{12}O_5$ , PM: 272.25 g/mol).

### 3.1.1 Estudios anticancerígenos

Los resultados de diferentes estudios sugieren que naringenina y naringina (glucósido), pueden ser agentes quimo-preventivos de contra cáncer. Naringenina ha mostrado ser capaz de inhibir el crecimiento de una gran variedad de líneas cancerígenas humanas *in vitro*. Ya que se ha descrito citotoxicidad contra células de cáncer humanos, tales como, seno (MDA-MB-435, MCF-7, MDA-231), colon (Caco-2), páncreas (pk-1), hígado (HepG2, Hep3B, Huh7), cérvix (HeLa, Hela-TG), estomago (KATOIII, MKN-7), y leucemia (HL-60, NALM-6, Jurkat, U937).<sup>287</sup> *In vivo* se reporta la capacidad de inhibir el crecimiento de células de sarcoma S-180 en ratones mediante inyección intraperitoneal o vía peroral.<sup>288</sup>

En un estudio de Wang B. *et al.*<sup>289</sup> se reportó la síntesis de un complejo constituido por una base de Schiff de naringenina como ligando, con el metal de transición La(III). Se muestra que la citotoxicidad del complejo es mayor que la actividad del ligando contra las células tumorales de leucemia humano (HL-60) y de adenocarcinoma de pulmón (A-549). Inclusive se reporta que la citotoxicidad del complejo de La(III) contra la línea celular A-549 es mayor a la actividad de cisplatino en un rango de concentración entre  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  mol/L.

### 3.1.2 Inhibición de ingesta de glucosa en células tumorales

La insulina promueve la proliferación celular, primero a través de la ruta de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Además la insulina puede promover la proliferación de células cancerígenas indirectamente mediante el incremento de las cantidades de glucosa disponible en las células. Estudios han mostrado que las células cancerígenas proliferan más rápidamente en respuesta a altos niveles de glucosa.<sup>290,291</sup> En este sentido existen reportes en los que se muestra que naringenina inhibe la ingesta de glucosa en células tumorales U937<sup>292</sup> y en adipocitos 3T3-L1.<sup>293</sup> Anne W. *et al.*<sup>294</sup> reportaron que naringenina es capaz de disminuir la proliferación de células de cáncer de seno mediante la disminución de la ingesta celular de glucosa estimuladas por insulina. Estos autores también reportaron que naringenina es un potencial inhibidor de las rutas celulares PI3K y MEK bloqueando la insulina basal y la ingesta de glucosa, estimulada por glucosa en cáncer de seno a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ .

### 3.1.3 Efecto antiaterogénico por inhibición de la enzima ACAT

La aterosclerosis es una enfermedad degenerativa y progresiva que se caracteriza por la degeneración del endotelio cardiaco debido formación de placas de ateroma constituidas por macrófagos y colesterol oxidado que un su mayoría provienen de las LDL, tendiendo a generar trombos y lesiones en el tejido cardiaco elevando el riesgo de infarto y accidente cerebrovascular. Las células esponjosas, presentes en la lesión aterosclerótica, se incrementan con la actividad de la enzima ACAT, ya que promueve la formación de LDL que transportan colesterol esterificado, por lo que un inhibidor de dicha enzima, puede ser usado como agente en la prevención y terapia de la aterosclerosis.<sup>295</sup> Uno de los métodos para disminuir el nivel de LDL (colesterol malo) en plasma es mediante la alimentación, es decir la reducción de la

ingesta de colesterol y lípidos en los alimentos que consumimos. Otro es inhibir la síntesis orgánica de colesterol.

Un aspecto muy importante para inhibir la síntesis de colesterol es que la síntesis de este es inhibida por la presencia de colesterol libre, cuando disminuye la concentración de colesterol libre en plasma se generan mecanismos para incentivar la producción de este. La enzima ACAT es la encargada de esterificar este colesterol libre y disminuir su cantidad. Por lo que la actividad de dicha enzima es responsable de aumentar la producción de colesterol al disminuir la concentración de colesterol libre al esterificarlo. Por esta razón se ha propuesto a los inhibidores de ACAT como coadyuvantes en la modulación de la producción de colesterol.

Es importante señalar que la formación de HDL (colesterol bueno) se realiza a partir de colesterol libre, con lo que una mejor disponibilidad de colesterol libre conlleva a una adecuada producción de HDL.<sup>295</sup> Una patente aprobada en Estados Unidos describe la capacidad de naringenina y naringina para inhibir 17.4% y 20.2% la actividad de la enzima ACAT respectivamente, administrada al 0.1% en ratas. También reportan que naringina y naringenina disminuyeron la cantidad de colesterol total en 32% y 18% respectivamente. También reportan que tanto naringenina como naringina se muestran más efectivos que lovastatina.<sup>296</sup> Lo cual sugiere que existe un mecanismo alternativo a la inhibición de la enzima HMG-CoA la cual es el objetivo a inhibir por la familia de las estatinas y la cual forma parte de la ruta de síntesis de colesterol.

Sin embargo existen trabajos posteriores como el de Lee MK *et al.* que reportan que naringenina así como un derivado de naringenina son capaces de disminuir la actividad tanto de ACAT como de HMG-CoA en ratas con una dieta alta en colesterol.<sup>297</sup>



Además una patente aprobada en los Estados Unidos y en la Unión Europea demuestra la capacidad de una preparación farmacéutica la cual contiene como principio activo naringenina, naringina, hesperidina y hesperetina de inhibir la agregación plaquetaria estimulada por colágeno en el plasma humano rico en plaquetas.<sup>298</sup>

### 3.1.4 Naringenina mejora dislipidemia

La dislipidemia aterogénica se caracteriza por elevadas concentraciones plasmáticas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) ricas en triglicéridos (TG) y de LDL ricas en colesterol, así como de niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Por otro lado se reporta que naringenina presenta el efecto de disminuir la concentración de lípidos en plasma<sup>299</sup> e inhibir la secreción de VLDL de hepatocitos de una manera similar a insulina.<sup>300,302</sup> Así también existen antecedentes de que naringenina previene la sobreproducción de apoB100 en VLDL en ratones alimentados con una dieta alta en grasas, disminuyendo acumulación hepática de TG, y atenuar el cuadro de dilipidemia.<sup>303</sup> Este hecho es relevante debido a que las concentraciones plasmáticas de apolipoproteína B100 (apoB100) contenida en partículas esta correlacionada directamente con los niveles de colesterol, haciendo de la inhibición de la secreción de apoB100 un atractivo objetivo terapéutico.

En un estudio reciente de Erin E. *et al.*<sup>304</sup> reportaron que naringenina es capaz de reducir los niveles de LDL y TG en un 50% en ratones a los cuales se les sometió a una dieta alta en grasas (42% de grasas) durante seis meses, con respecto a ratones a los que se les sometió a la misma dieta y a los cuales no se les administro naringenina. También se reportó que la dosificación de naringenina redujo los niveles de VLDL y mantuvo los niveles iniciales de HDL. También reportan que naringenina es capaz de reducir los niveles de glucosa

en plasma y que es capaz de normalizar los niveles de insulina en ratas a las que se les sometió a la dieta alta en grasas. Por último reportaron que la disminución de colesterol fue de 70% en segmentos de aorta de las ratas alimentadas con la misma dieta por lo que también se logró reducir el área afectada por aterosclerosis.

### 3.1.5 Naringenina inhibe virus de hepatitis C (HCV)

Yaakov Nahmias *et al.* reportaron la capacidad de naringenina para inhibir la secreción del virus de la hepatitis C (HCV) probado en hepatocitos infectados con una eficacia del 70% con una dosis de 200µM en un periodo de 24 horas.<sup>305</sup> También reportaron que naringenina era capaz de inhibir la expresión de apoB100. Los autores relacionan el metabolismo de lípidos con la capacidad del virus para difundirse en el organismo, en particular asocian la actividad de la apolipoproteína apoB100 con una mayor incidencia de HCV.

## 3.2 Quercetina

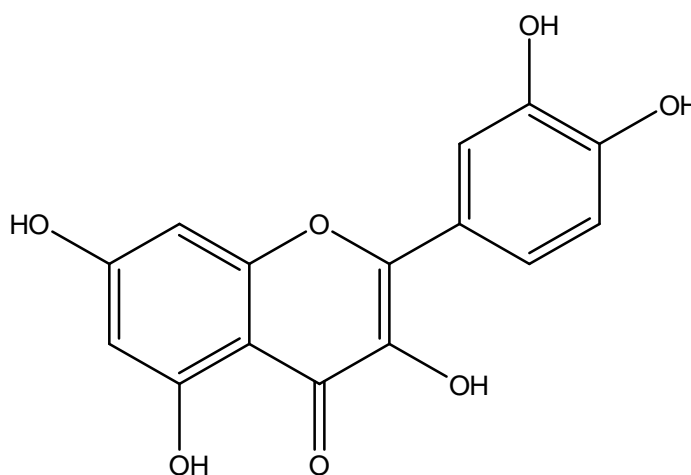
La quercetina (**Fig.18**) está catalogada en la familia de los flavonoles (**Fig.2**). Los flavonoles están presentes en una gran variedad de frutas y vegetales. En poblaciones occidentales se estima la ingesta diaria de flavonoles en un rango entre 20-50 mg/día, de esta cantidad cerca de 13.8 mg/día pertenece a quercetina y sus derivados,<sup>306</sup> convirtiéndolo en el flavonoide más común en la dieta humana.

Sobre la biodisponibilidad de quercetina existen diferentes reportes donde se analiza el efecto de la suplementación con quercetina en los niveles plasmáticos. La suplementación con 1000 mg/día por seis semanas incrementa la concentración de 71 a 269 nmol/L.<sup>307</sup> Otro estudio llevado por 12 semanas y donde se suministraron dosis de 500 y 1000 mg/día produjo un incremento en

la concentración plasmática de quercetina de 332 y 516  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente.<sup>308</sup>

### 3.2.1 Actividad Antioxidante

Existen un gran número de investigaciones sobre modelos animales llevados *in vitro* y también *in vivo* orientados en el potencial antioxidante de quercetina.<sup>309,313</sup> La evidencia animal sugiere que los efectos antioxidantes de quercetina propicia protección para diferentes órganos entre ellos cerebro, corazón, y otros tejidos contra lesión isquémica, compuestos tóxicos, y otros factores que pueden inducir estrés oxidativo.



**Fig.18.** Quercetina. 3,3',4',5,7-Pentahidroxi flavona

Entre las principales virtudes de la quercetina destaca su capacidad reactiva sobre los radicales libres, ejerciendo un papel citoprotector en situaciones de peligro de daño celular. Su capacidad antioxidante medida como Trolox es de 4.7 mM, lo que equivale a 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C. Su hidrosolubilidad es análoga a la de la vitamina E. En términos bioquímicos, la razón de la constante de la reacción química de la quercetina con el oxígeno es de  $8,9 \times 10^5$ .<sup>314,315</sup>

Sin embargo, y como otros compuestos antioxidantes, quercetina puede tener actividad pro-oxidante, al menos bajo algunas circunstancias. La ingesta de quercetina (20 mg/día) a largo plazo incrementa los niveles séricos y hepáticos de alfa-tocoferol(vit E), y disminuye significativamente los niveles de malondialdehído (proveniente de peroxidación lipídica), pero decrece significativamente los niveles de glutatión (GSH) y de glutatión reductasa(GR) la cual es una de las principales enzimas antioxidantes del organismo.<sup>316</sup>

Pero existen resultados cruzados, por ej., ratones alimentados con 1mg/día de quercetina incrementa la relación GSH/GSSG en tejido hepático, y no hubo cambio de esta relación en plasma ni en tejido cardiaco ni en plasma, mientras que redujo esta relación GSH/GSSG en mitocondria cardiaca.<sup>309</sup>

Por su parte Mary C.W., *et al.* reportaron que quercetina *in vitro* puede aumentar la expresión de  $\gamma$ -glutamilcisteina sintetasa (GCS), la cual es el primer paso en la síntesis de glutatión, a concentraciones menores a 25 $\mu$ M, mientras que a concentraciones mayores a 25  $\mu$ M la concentración de GSH tendió a la baja hasta una concentración de 50  $\mu$ M.<sup>317</sup> Estos resultados sugieren que quercetina tiene efectos complejos en función de sus efectos antioxidantes/prooxidantes en diferentes tejidos, así como de la concentración utilizada.

Por otro lado quercetina mostró capacidad para disminuir la concentración de LDL-ox en personas obesas con síndrome metabólico, a una dosis de 150 mg/día.<sup>307,318</sup> Quercetina como muchos antioxidantes son capaces de inhibir la peroxidación lipídica lo que está relacionado con su capacidad de mantener el equilibrio oxidativo del cuerpo.

De manera reciente Nagaraja H. *et al.* reportaron la capacidad de quercetina para estimular enzimas relacionadas con el mecanismo antioxidante, ya que puede aumentar *in vivo* la concentración de enzimas conocidas por su función

antioxidante. Además también puede disminuir algunos parámetros relacionados con una mayor oxidación, como la presencia de lipoperóxidos y de corticosterona, principalmente, en condiciones de estrés. Los investigadores sometieron a estrés físico a tres grupos de ratas durante 14 días, y a las cuales se les administraron dosis de 10, 20 y 30 mg/Kg respectivamente. A otros tres grupos, a los cuales no se les sometió a condiciones de estrés, también se les administraron las mismas concentraciones de quercetina.

Como resultado los autores obtuvieron que quercetina es capaz de aumentar los niveles séricos de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y glutatión peroxidasa (Gpx), las cuales son enzimas antioxidantes, en los grupos de ratas sometidas a estrés, y disminuir los niveles de lipoperóxidos y corticosterona (marcadores de estrés) en grupos de ratas que también fueron sometidas a las mismas condiciones estresantes.<sup>319</sup>

### **3.2.2 Actividad cardiovascular**

La misma propiedad antioxidante previamente descrita sugiere la capacidad para reducir el riesgo de muerte por dolencias y lesiones cardíacas relacionadas con lipooxidación. En ese sentido, quercetina ha demostrado disminuir la incidencia de infarto de miocardio y de derrames cerebrales en personas de tercera edad. Las poblaciones que consumen productos ricos en este flavonoide estadísticamente presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares.<sup>320</sup> También la suplementación de quercetina atenúa el desarrollo de hipertrofia inducida por presión elevada en ratas.<sup>321</sup>

En humanos, quercetina inhibe la agregación plaquetaria y la formación de trombos.<sup>322</sup> Sin embargo, una dieta suplementada con quercetina no retarda el inicio o disminuye la severidad de las complicaciones cardiovasculares que se desarrollan en ratas hipertensivas.<sup>323</sup>

### 3.2.3 Diabetes

Se ha reportado que quercetina es capaz de normalizar concentraciones de glucosa en sangre, preservar la integridad y función de las células pancreáticas- $\beta$ , y ayudar a proteger contra diabetes inducida en modelos animales,<sup>324-326</sup> en estudios llevados a cabo en un periodo de 30 días. Quercetina también parece ser benéfica en neuropatía diabética y dolor neuropático en ratas con diabetes inducida.<sup>327-328</sup>

### 3.2.4 Actividad antiinflamatoria

*In vitro*, quercetina inhibe enzimas pro-inflamatorias, como ciclooxigenasa II (COX-2) y lipooxigenasa (LOX).<sup>329,330</sup> También inhibe TNF- $\alpha$ ,<sup>331</sup> y la sobreproducción de óxido nítrico mediante la inhibición de la expresión de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS).<sup>332</sup>

*In vivo*, experimentación animal también apoya un efecto antiinflamatorio *in vitro*, ya que quercetina atenúa la respuesta inflamatoria la respuesta inflamatoria inducida por carragenina,<sup>333</sup> y una dieta alta en grasas.<sup>334</sup> Además quercetina reduce la producción de TNF- $\alpha$  y óxido nítrico por la modulación de NOS en tejido adiposo de ratas obesas.<sup>335</sup> En ratas inducidas con artritis crónica, quercetina disminuye los signos de la artritis comparado con un control no tratado.<sup>336</sup>

### 3.2.5 Actividad antitumoral

Una gran cantidad de experimentos han sido llevados a cabo tanto *in vitro* como *in vivo* para intentar elucidar los efectos de quercetina contra el cáncer. *In vitro* la evidencia indica que quercetina tiene una gran variedad de mecanismos anticáncer, incluyendo antioxidante, antiproliferativo, pro-apoptótico, efectos de señalización celular, y supresor de factor de

crecimiento,<sup>337</sup> así como ejercer sinergia con algunos agentes quimioterapéuticos utilizados comercialmente.<sup>338-341</sup> Quercetina también se ha mostrado capaz para inhibir el crecimiento del cáncer *in vivo* en modelos animales diseñados para promover la formación tumoral.<sup>342,343</sup>

En cultivos de células tumorales humanas (colon, estómago y ovario) ha demostrado frenar el proceso proliferativo, afectando a la célula en el ciclo G1-S de la fase de transición.<sup>344</sup> En células ováricas tumorales quercetina demostró inhibir el crecimiento operacional y la capacidad de señal de transducción. También evidenció reducir químicamente la inducción de colonias neoplásicas en ratas como así también ejercer un efecto citotóxico en células escamosas, carcinomas de cabeza y cuello uterino tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>345</sup> Por otra parte existen reportes *in vitro* que sugieren que quercetina presenta un rol positivo para revertir la resistencia que presentan algunas drogas anticancerígenas, y re-sensibilizar a las células cancerosas a algunos agentes quimioterapéuticos.<sup>346-348</sup> Quercetina también puede potenciar la efectividad de algunos agentes anticancerígenos como cisplatino y algunos de sus derivados.<sup>348-351</sup>

### 3.2.6 Regulación de la proteína mutante p53

El gen p53 también conocido como "el guardián del genoma", es uno de los genes mayormente mutado en los cánceres humanos. El gen p53 tiene la función de detener el ciclo celular en la fase G1, en células dañadas por agentes nocivos del ADN o por hipoxia, para inducir la reparación del ADN mediante la activación de la transcripción de genes inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina CDKN1A (p21) y GADDA45. Si el ADN se repara satisfactoriamente el ciclo celular continúa. Sin embargo si la reparación fracasa, la activación del gen BAX, inducido por p53, pondrá en marcha la apoptosis. En células con mutaciones del gen p53, la lesión de ADN no

conlleva a la detención del ciclo celular ni a la reparación de ADN, por lo que las células con alteraciones genéticas proliferan y terminan por generar un proceso neoplásico.<sup>352</sup>

En este sentido se ha encontrado que quercetina (248 $\mu$ M) regula a la baja la expresión de la proteína p53 a niveles casi indetectables en células de cáncer humano. Concentraciones más bajas produjeron una menor reducción de p53. En este estudio, la inhibición de la expresión de p53 propició el paro del ciclo celular en G2-M. Esta regulación se dio en una medida mucho menor en células con el gen p53 intacto.<sup>353</sup>

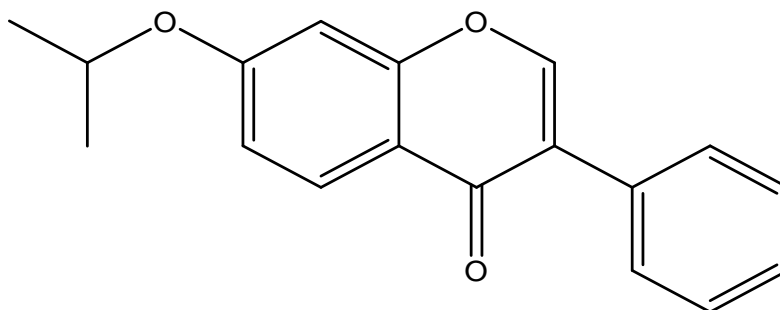
Quercetina también puede detener el ciclo celular en la fase G1 en células T de leucemia humana, a una concentración de 70 $\mu$ M.<sup>354</sup> Este paro del ciclo en G1 también ha sido visto en células de cáncer gástrico con un efecto reversible al suspender el suministro de quercetina, lo que produce una disminución del 10% del crecimiento celular a una concentración de 70 $\mu$ M.<sup>355</sup>

### 3.3 Ipriflavona

Es un derivado sintético de la isoflavona daidzeína, y presenta acción inhibitoria de la resorción ósea. Se han observado sus efectos benéficos en pacientes con osteoporosis posmenopáusica o senil, y algunos estudios indican su posible utilidad en pacientes con enfermedad de Paget, osteodistrofia renal y dolor vertebral osteoporótico. El tratamiento es prolongado, resultados del incremento leve de la masa mineral se observan tras 3 meses de administración. Administrada por vía oral, alcanza el pico plasmático en alrededor de 2 horas. La biodisponibilidad aumenta si es administrada con la comida. Sufre extensa metabolización hepática, siendo algunos de sus metabolitos activos. Alrededor de 40% de la dosis ingerida es excretada como metabolitos por la orina. También existe una significativa eliminación por vía



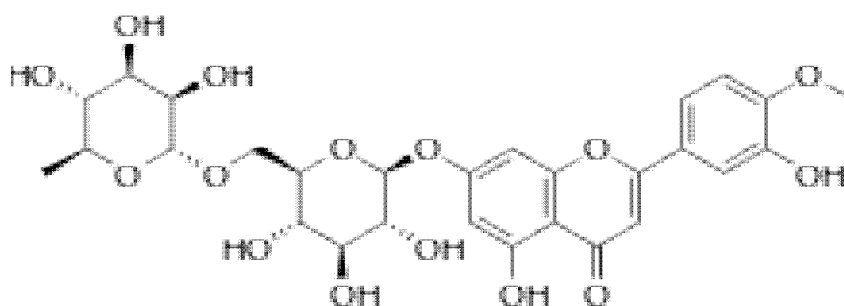
biliar. El mecanismo de acción es desconocido, pero se sabe que puede aumentar en algunos tejidos la respuesta al estímulo estrogénico, por ejemplo, incrementa la liberación de calcitonina inducida por estrógenos.<sup>356,357</sup>



**Fig.19.** Ipriflavona; 7-isopropoxiisoflavona

### 3.4 Diosmina

La diosmina es un flavonoide semisintético (**Fig.19**) derivado de la flavanona hesperidina, utilizado de manera similar al flavonol rutina en el tratamiento de los trastornos venosos, como antivaricoso sistémico y vasoprotector. También en síndrome prevaricoso (piernas pesadas, edema, telangiectasia), várices, síndromes hemorroidales, estados hemorrágicos ligados a fragilidad capilar: epistaxis, accidentes de la hipertensión, nefritis hematúrica, hemorragias ginecológicas.

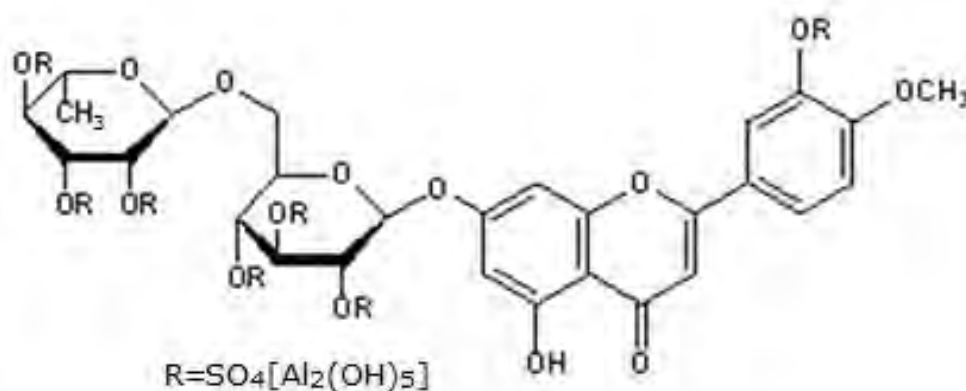


**Fig.20.** Diosmina

La dosis usual es de 450mg, 2 veces al día (con el almuerzo y con la cena). En las crisis hemorroidales agudas se administran hasta 2.7g diarios. Tan pronto se obtengan los resultados buscados, y después de un período de consolidación de 2 a 6 semanas, se reduce la dosis a 0.9g diarios.<sup>358</sup>

### 3.5 Dosmalfato

El dosmalfato (**Fig.20**) es un fármaco de acción local desarrollado por la empresa española FAES FARMA, previene las lesiones gástricas inducidas por los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en los tratamientos antirreumáticos. Comercializado con el nombre de Diotul, dosmalfato posee un interesante perfil farmacológico como agente citoprotector con una excelente capacidad de protección de la mucosa gastrointestinal, frente a la potencial aparición de úlceras agudas o crónicas.



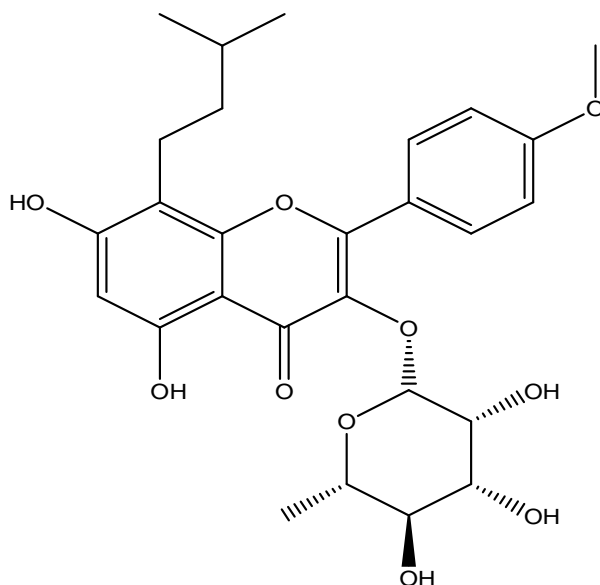
**Fig.21.** Dosmalfato

El dosmalfato se utiliza para tratar la úlcera péptica además de ser un protector de la mucosa gástrica. El dosmalfato es un complejo alumínico del flavonoide diosmina, capaz de formar un gel espeso a pH ácido. Este gel viscoso reacciona con los componentes de la secreción ácida,

fundamentalmente con la pepsina, disminuyendo hasta un 15-25% su actividad.<sup>359</sup>

### 3.6 Icarisid II

Los fármacos inhibidores de PDE5 (fosfodiesterasa 5) como, sildenafil, tadalafil y vardenafil, han sido usados en el tratamiento de la disfunción eréctil. Estos inhibidores evitan la degradación de cGMP, lo que causa relajación muscular.



**Fig.22.** Icarisid II

En 2008 Dell'Agli *et al.*<sup>360</sup> sintetizaron Icarisid II, (derivado prenilado de Icarisid, aislado de la planta coreana *Epimedium wanshanense*), el cual es un potente inhibidor de PDE5 (**Fig.22**). También se reportan efectos sobre la producción de NO, J. Zhang, et al. reportaron que Icarisid II es capaz de incrementar los niveles celulares de cGMP mediante la estimulación de la isoforma inducible de la oxido nítrico sintasa (iNOS), lo cual incrementa los niveles de NO, y conducir a la vasodilatación. También reportan que este efecto no es presentado por el fármaco sildenafil.<sup>361</sup>

#### 4. COMPUESTOS NITRADOS DE USO FARMACOLÓGICO

Desde hace mucho tiempo se han sintetizado numerosos compuestos nitrados tales como los nitrobenzofuranos y nitrofuranos, los cuales típicamente se han usado como antimicrobianos, agentes antituberculosos, antihelmínticos, parasiticidas, y con muchas otras actividades antibióticas que se le atribuyen a la presencia del grupo nitro,<sup>362</sup> ya que se ha postulado que disminuye el potencial reductor de algunos microorganismos al utilizar electrones de las proteínas en la mitocondria para la reducción del grupo nitro.<sup>363</sup>

También se puede mencionar a la familia de los imidazoles, donde se encuentra metronidazol, ornidazol y tinidazol, que son derivados nitrados que presenta actividad amebicida, tricomonocida y bactericida.<sup>364</sup> Estos son activos frente a la mayoría de bacterias anaerobias y protozoarias por reducción química intracelular. Actúan interfiriendo con la síntesis de ADN en los microorganismos susceptibles. Están indicados en el tratamiento del absceso hepático amebiano, amebiasis intestinal, giardiasis, infecciones genitourinarias y óseas, neumonía, septicemia, sinusitis, tricomoniasis, así como en la profilaxis de infecciones preoperatorias en cirugía digestiva y ginecológica.<sup>365</sup>

Por otro lado ya desde hace casi 150 años, Sir Lauder Brunton publicó el primer tratamiento de la angina de pecho con nitratos. Desde entonces, estos fármacos han estado en la primera línea de la atención al paciente coronario, ya que tienen propiedades que otros fármacos no pueden igualar.<sup>366</sup>

##### 4.1 Nitroprusiato

El nitroprusiato de sodio es un vasodilatador periférico que actúa sobre el músculo liso de los territorios venoso y arterial, se desconoce el mecanismo celular concreto (posiblemente como donador de óxido nítrico). El efecto es más manifiesto en hipertensos que en normotensos. Por su doble acción

produce disminución del retorno venoso con disminución de la precarga y vasodilatación arterial disminuyendo la postcarga.

En pacientes hipertensos produce un leve incremento de la frecuencia cardíaca con disminución del gasto cardíaco. En los pacientes con insuficiencia cardíaca mejora el rendimiento ventricular aumentando el índice cardíaco y el volumen sistólico y disminuyendo el consumo de oxígeno miocárdico. Produce vasodilatación renal. A pesar de su relativa seguridad, su uso no está exento de complicaciones, de las cuales la más importante es la intoxicación por cianuro. Esto se debe a que el NTS está formado por 5 grupos cianuros, de modo que al metabolizarse quedan libres. Si se sobrepasa la capacidad fisiológica de tamponar estos grupos cianuros, se producirá intoxicación y la hipoxia tisular resultante.<sup>367</sup>

#### 4.2 Nitroflurbiprofeno

El nitroflurbiprofeno es un antiinflamatorio no esterooidal (AIN'S) el cual tiene la habilidad de liberar oxido nítrico. Tiene el potencial para ser usado en el tratamiento de incontinencia urinaria, enfermedad de Alzheimer y la prevención y de la osteoporosis. Además de ser un inhibidor de la COX-1 y la COX-2,<sup>368</sup> y de NF-kB,<sup>369</sup> y de iNOS.<sup>370</sup>

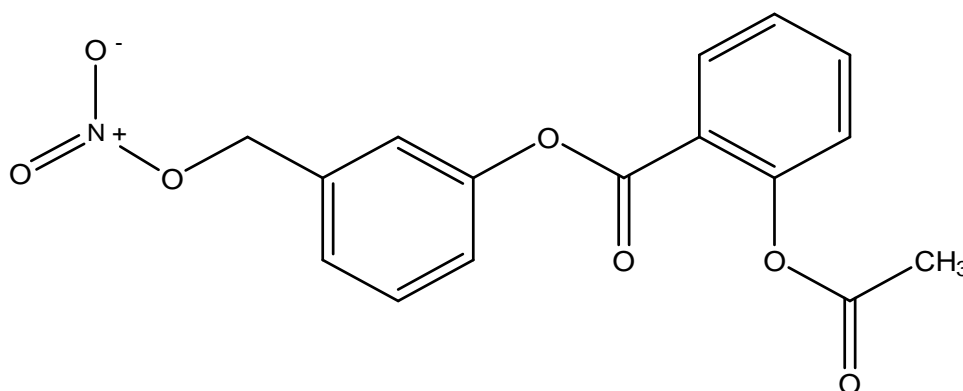
El nitroflurbiprofeno es igual de potente que flurbiprofeno pero se reportan menores efectos secundarios, además de que tiene la capacidad de incrementar cGMP mediante la liberación de oxido nítrico.<sup>371</sup>

#### 4.3 Nitroaspirina

La nitroaspirina (**Fig.22**) es similar a la aspirina tradicional, pero diferente en una manera, y es que la molécula de aspirina ha sido modificada para liberar óxido nítrico (NO). El óxido nítrico es una molécula muy importante que tiene

múltiples efectos dentro del sistema cardiovascular y el sistema respiratorio. La nitroaspirina combina el efecto analgésico y antiagregante plaquetario de la aspirina con la propiedad vasodilatadora del NO.

Nitroaspirina es gástricamente más tolerable al presentar efectos secundarios menores a su par aspirina,<sup>372</sup> además de ser más eficiente tanto para inhibir la agregación plaquetaria,<sup>373,374</sup> como trombosis.<sup>375</sup> Nitroaspirina es un inhibidor selectivo de COX-1 a diferencia de la aspirina que es un inhibidor no selectivo de ambas isoformas. Sin embargo nitroaspirina también es capaz de inhibir a COX-2 mediante un mecanismo relacionado con su capacidad de ser donador de NO.<sup>376</sup>



**Fig.23.** Nitroaspirina

#### 4.4 Estudios comparativos entre fármacos y sus derivados nitrados

En un estudio publicado por Del Soldato, Piero *et al.*,<sup>377</sup> se reportó la actividad antiinflamatoria, analgésica y antitrombótica de una serie de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE'S) de actual uso comercial y sus correspondientes derivados nitrados, de igual manera se reportan su actividad inhibitoria de la ciclooxigenasa (COX). Es sabido de la eficacia antiinflamatoria y antitrombótica, pero por encima de todo, la tolerancia AINE, parece estar

considerablemente afectada por su actividad de la COX en el sitio inflamatorio, así como en el tejido sano.

Los resultados mostrados en tablas son la razón de potencia en comparación con el patrón de referencia. Las actividades son expresadas como la razón comparada con el producto natural usado como patrón unitario. Es decir solo se muestra cuantas veces es más o menos activo el nitroderivado que el compuesto de referencia.

Como puede observarse por los datos mostrados en las tablas 8 a 10, las actividades farmacodinámicas (I y II en la **Tabla 8**; **Tabla 9**) y la tolerancia (**Tabla 8**, columna III) de los nitroderivados muestran un mejor equilibrio en comparación con los productos originales no nitrados.

En la **Tabla 8** se muestra el estudio de las propiedades antiinflamatorias (I) y analgésicas (II) (farmacodinámica) y de la tolerancia gastrointestinal (III) (toxicidad) de los compuestos de ensayo después de la administración oral de dosis que van de 3 a 30 mg/Kg en suspensiones de carboximetilcelulosa y construyendo curvas dosis respuesta.

Compuesto de ensayo	I	II	III
Nitroderivado Aspirina	1.2 1.0	1.1 1.0	0.2 1.0
Nitroderivado Diclofenaco	1.3 1.0	0.9 1.0	0.3 1.0
Nitroderivado Ketoprofeno	1.0 1.0	1.2 1.0	0.1 1.0
Nitroderivado Ibuprofeno	1.0 1.0	1.1 1.0	0.1 1.0
Nitroderivado Flurbiprofeno	1.0 1.0	1.0 1.0	0.1 1.0

Nitroderivado	1.0	1.0	0.1
Ketorolaco	1.0	1.0	1.0
Nitroderivado	0.9	1.3	0.1
Acido tiaprofenico	1.0	1.0	1.0
Nitroderivado	1.3	1.3	0.1
Naproxeno	1.0	1.0	1.0

**Tabla 8.** Farmacología de nitroderivados. Columna. I y II; Toxicología columna. III. Los resultados mostrados son la razón de potencia en comparación con el patrón de referencia. Las actividades son expresadas como la razón comparada con el producto natural usado como patrón unitario. El nitroderivado es el de los ejemplos mostrados, el compuesto natural de referencia es el mostrado como referencia.

En la **Tabla 9** se muestran primero, las propiedades anticiclooxygenasa (I), de antiagregación plaquetaria (II) y vasodilatadora (III) de los compuestos de ensayo estudiadas in vitro a concentraciones en el rango molar de  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  del producto en agua/alcohol con adición de pequeñas cantidades de DMSO (dimetilsulfóxido). Las actividades son expresadas como la razón de potencia frente al producto natural usado como patrón unitario.

Compuesto de ensayo	I	II	III(*)
Nitroderivado	1.5	3.0	60
Aspirina	1.0	1.0	Inactivo
Nitroderivado	1.8	1.8	50
Diclofenaco	1.0	1.0	Inactivo
Nitroderivado	1.2	1.8	50
Ketoprofeno	1.0	1.0	Inactivo

**Tabla 9.** Actividad farmacodinámica de nitroderivados. (\*) % de acción inhibitoria del vasoespasmo inducido por epinefrina.

En la **Tabla 10** se muestra el estudio y comparación de las propiedades anticiclooxygenasa (COX-1/COX-2) en células aisladas. Respuesta expresada como % de los controles son variabilidad de respuesta relativa.

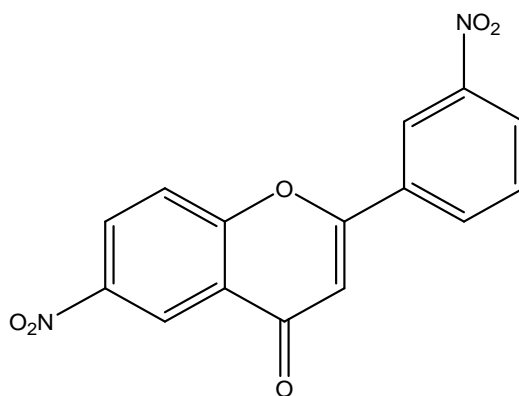


Compuesto de ensayo	Dosis mg/ml (Solución de la tabla 2)	COX-1	COX-2
Nitroderivado Diclofenaco	0.1	49±6	45±3
	1.0	29±4	22±4
Nitroxibutiléster de diclofenaco	0.1	45±22	68±11
	1.0	24±10	41±11
Nitroderivado Flurbiprofeno	0.1	51±5	47±4
	1.0	22±3	18±2
Nitroxibutiléster de flurbiprofeno	0.1	48±18	46±23
	1.0	29±13	22±14

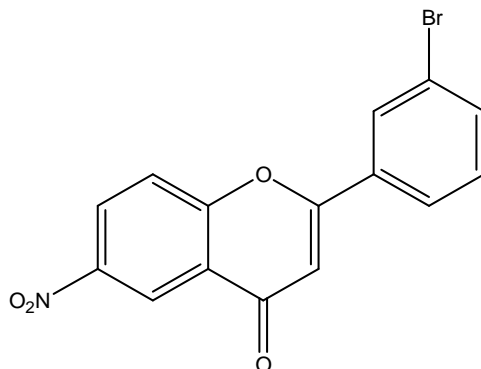
**Tabla 10.** Actividad inhibitoria de la COX de nitroderivados.

#### 4.5 Nitroflavonas

Existen reportes en los que se han estudiado diferentes flavonas y flavanonas nitradas por tener propiedades ansiolíticas (reducción de la ansiedad), sin la correspondiente depresión del sistema nervioso central como es común en las benzodiazepinas.



*6,3'-dinitroflavona; bajo patente.*



*6-bromo-3'-nitroflavona; con potentes y selectivas propiedades ansiolíticas*

**Fig.24.** Nitroflavonas con propiedades ansiolíticas.

El estudio del grupo de los flavonoides con alguna actividad psicotónica o psicoestimulante, como por ejemplo el uso de algunas flavanonas como antidepresivos es la propiedad menos estudiada de estos compuestos. En este sentido se reporta que este tipo de compuestos presentan afinidad por el receptor para benzodiazepinas en ratones.<sup>378</sup> Sin embargo también se reporta que esta afinidad no es tan fuerte como la de Diazepam.<sup>379</sup>

Alternativamente también existe evidencia de propiedades anticancerígenas encontradas tanto en flavonoides de origen natural como de origen sintético. Un ejemplo es el estudio realizado por Cárdenas M., *et al.*<sup>380</sup> donde se estudió la actividad antiproliferativa de diferentes flavonoides de origen natural. En este estudio se probaron cuatro derivados del ácido cinámico, y veinte flavonoides de origen sintético, que fueron probados *in vitro* a una concentración de 20  $\mu$ M contra cuatro líneas celulares tumorales humanas (**Tabla 11**), tales como adenocarcinoma cérvico (Hela), carcinoma orofaríngeo (KB), cáncer de seno (MCF-7), células WISH (células derivadas del epitelio amniótico) y melanoma (MCF-7), y cuatro líneas celulares de ratón adenocarcinoma mamario (F3II y LM3), cáncer de pulmón (LP07), y melanoma (B16-F0). Adicionalmente células epiteliales derivadas de glándula mamaria

normal de ratas (NMuMG) y células de fibroblasto de embriones de ratón (3T3) que fueron usados como controles.

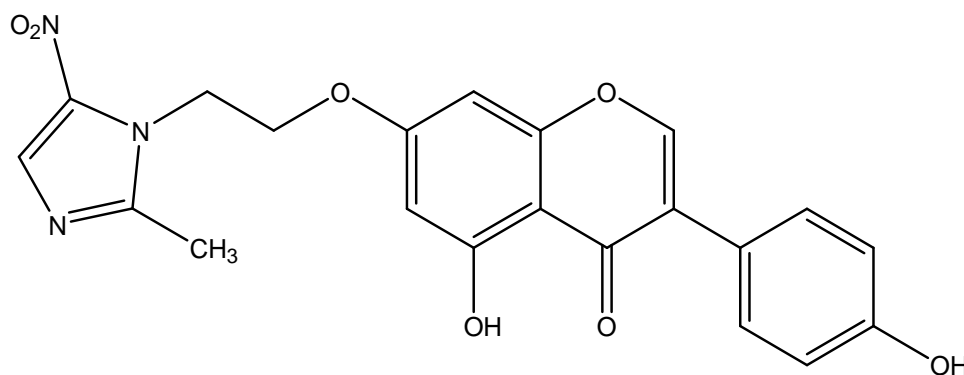
Basados en sus concentraciones de inhibición media  $IC_{50}$  los compuestos más potentes fueron el n-butil ester del ácido cafeico, 2'-nitroflavona, ester etílico del ácido cafeico, 2',6-dinitroflavona, apigenina, 3'-bromoflavona y 2'-fluoro-6-bromoflavona, ordenados de mayor a menor potencia.

Compuesto	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)								
	Líneas celulares					Líneas celulares de ratones			
	HeLa	KB	WISH	MCF-7	SK-MEL-28	F3II	LM3	LP07	B16-F0
Crisina	13 $\pm$ 2	13 $\pm$ 2	-	-	-	-	17 $\pm$ 6	-	22 $\pm$ 2
Apigenina	6 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	-	17 $\pm$ 2	-	-	11 $\pm$ 4	18 $\pm$ 3	16 $\pm$ 4
$\alpha$ -Naftoflavona	-	-	-	20 $\pm$ 1	-	-	14 $\pm$ 2	-	22 $\pm$ 3
$\beta$ -Naftoflavona	-	-	-	20 $\pm$ 1	-	-	-	-	-
Ester etílico del ac.cafeico	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	10 $\pm$ 3	-	-	-	3 $\pm$ 1	15 $\pm$ 3	-
n-butil ester del ac.cafeico	2 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	16 $\pm$ 5	11 $\pm$ 3	5 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2
6-Cloroflavona	-	-	-	22 $\pm$ 7	-	-	-	-	-
6-Bromoflavona	-	-	-	19 $\pm$ 2	-	-	-	-	-
3'-Bromoflavona	-	-	-	10 $\pm$ 2	-	-	-	-	-
4'-Nitroflavona	-	-	-	20 $\pm$ 1	-	-	-	-	-
2'-Nitroflavona	3 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	-	19 $\pm$ 4	4 $\pm$ 1	-	-
2',6-Dinitroflavona	3 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	-	-	-	9 $\pm$ 3	-	-
2'-Fluoro-6-cloroflavona	13 $\pm$ 3	16 $\pm$ 3	-	-	-	-	-	-	-
2'-Fluoro-6-bromoflavona	9 $\pm$ 3	16 $\pm$ 5	-	-	-	-	-	-	-
2'-Clorocrisina	12 $\pm$ 2	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 11.** Actividad antiproliferativa de diferentes flavonoides de origen natural y sus derivados sintéticos.

El análisis de los compuestos mono sustituidos en los anillos B y C, mostró que el átomo de bromo en la posición 3' y un grupo nitro en el carbón 4' o 2' generaron compuestos activos. Sin embargo, la flavona sintética más poderosa fue la 2'-nitroflavona, la cual redujo significativamente el crecimiento de las líneas celulares HeLa, KB, WISH, MCF-7, F3II, y LM3.

Por otro lado también existen investigaciones en las que se combinan estructuralmente flavonoides con compuestos de actual uso farmacológico. Por ejemplo esta el caso de caso de metronidazol el cual ha servido de base para acoplar flavonas e isoflavonas para aumentar sus propiedades antimicrobianas y/o disminuir los efectos secundarios del fármaco original. Tal es el caso del compuesto de la **Fig.25** que es 100 veces más potente que metronidazol.<sup>381</sup>



**Fig.25.** Antimicrobiano con estructura de metronidazol e isoflavona.

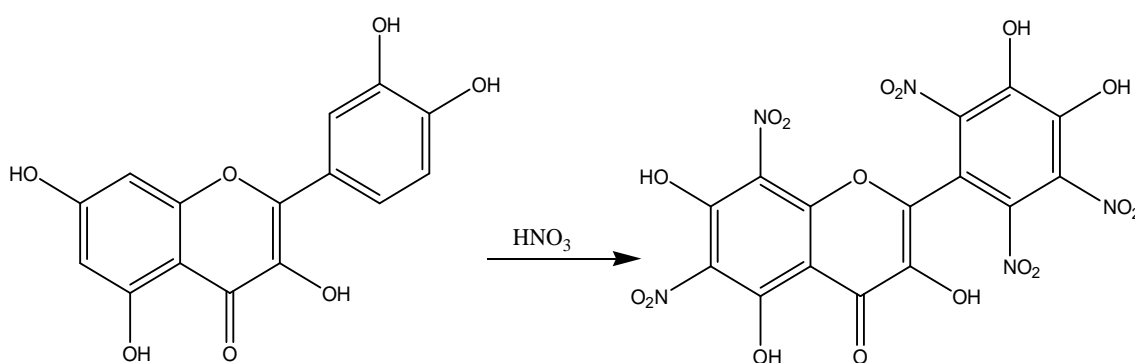
## 5. REACCIONES DE NITRACIÓN EN FLAVONOIDES

La nitración de anillos simples está bien fundamentada en la literatura química, que generalmente abarca la utilización de ácido nítrico como agente nitrante en condiciones drásticas de reacción. La importancia de efectuar la

nitración en flavonoides radica en que ofrece la posibilidad de que al cambiar la estructura se puedan aumentar sus efectos farmacológicos descritos y con la posibilidad de disminuir los efectos secundarios adversos que se presentan en algunos fármacos de origen totalmente sintético con un grupo nitro en su estructura. En este sentido se ha empleado el sistema  $\text{HNO}_3$ /bentonita satisfactoriamente para preparar nitroderivados del  $3\beta$ -sitosterol y del colesterol,<sup>384</sup> el grupo OH de estos compuestos se acetila para evitar su oxidación.

Sin embargo se han probado métodos convencionales de nitración un ejemplo es la nitración del flavonoide miricetina del cual se han obtenido derivados nitro, azo y bromo. Estos compuestos sintetizados reportan potencial antitumoral, antimicrobiano y antioxidante.

La nitración directa de este tipo de compuestos utilizando ácido nítrico, produce la nitración en todas las posiciones susceptibles de reacción (**Fig.25**), además de producirse un gran número de combinaciones. Este tipo de reacciones hace muy difícil pronosticar las posiciones en la sustitución así como el número de derivados.<sup>388</sup>



**Fig.26.** Nitración no selectiva de miricetina. Acido nítrico como agente nitrante.

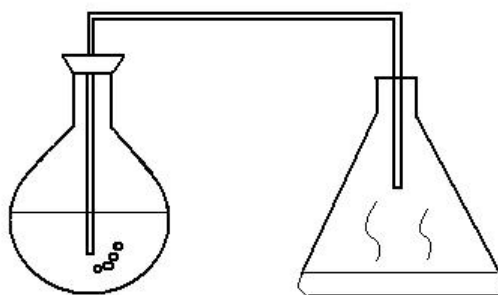
El ácido nítrico es un agente nitrante de amplio uso en la síntesis de un gran número de compuestos orgánicos que poseen igual número de usos en la industria química. Por su naturaleza fuertemente ácida es un potente agente oxidante por lo que es adecuado en la nitración de compuestos que no son lábiles a la oxidación o a la degradación como hidrocarburos o moléculas sencillas en las que no existan o sean pocos los grupos funcionales que no sean fácilmente oxidables. Por lo que la utilización de ácido nítrico en la obtención de productos nitrados partiendo de moléculas de origen natural que generalmente presentan estructuras complejas con dobles enlaces susceptibles a la degradación o grupos funcionales como -OH que generan productos de oxidación. En una reacción con sustratos lábiles y fuertes condiciones de reacción tienden a provocar que el sustrato sea sustituido en un gran número de posiciones dentro de la molécula por lo que es difícil esperar compuestos mono-sustituidos, por lo que es difícil predecir el resultado de la reacción, además de que también es común la degradación del sustrato.

En la historia de los compuestos derivados, la obtención de derivados nitrados es muy amplia, se ha encontrado que la adición de un grupo nitro a algunas moléculas, como los benzofuranos y a algunos flavonoides no sustituidos trae un aumento en su actividad biológica. El hecho de que los flavonoides poseen numerosos grupos hidroxilo y algunos un doble enlace los hace susceptibles a la oxidación, debido a esto es necesario encontrar condiciones suaves de reacción que eviten la posible degradación.

### **5.1 Nitración "suave" de naringenina utilizando una mezcla de gases NO<sub>x</sub>**

Se ha descrito la nitración de benzofuranos utilizando una mezcla de gases que se llaman gases NO<sub>x</sub> (NO<sub>2</sub>, NO, N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>), siendo el agente nitrante

el  $N_2O_4$ , que se generan *in situ* al oxidar tetrahidrofurano (THF) con ácido nítrico concentrado produciéndose como producto secundario ácido succínico.<sup>382</sup> También se ha usado el  $N_2O_4$  para nitrar regioselectivamente nitrilos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados.<sup>383</sup> Este método se ha utilizado con éxito para obtener algunos derivados nitrados de benzofuranos en condiciones suaves de reacción. Se basa en la oxidación del THF por el  $HNO_3$ , este al reducirse produce la mezcla de óxidos de nitrógeno denominados gases  $NO_x$ . Los gases se generan en un matraz aparte donde se presenta la reacción entre el THF y el ácido nítrico (**Fig.26**). Los gases nitrantes llegan al matraz que contiene el sustrato mediante un tubo de vidrio el cual comunica los dos matraces.



**Fig. 27.** Generación *in situ* de gases  $NO_x$

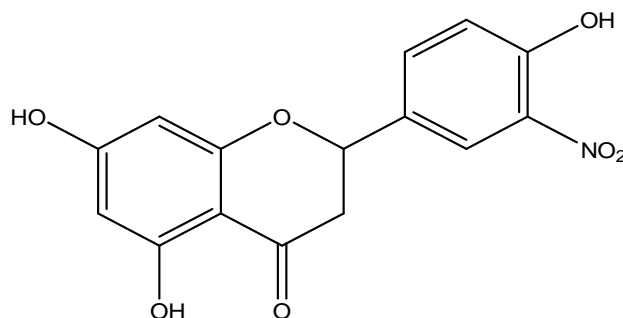
## 5.2 Nitración utilizando nitratos de metales de transición

Con este método se han podido realizar nitraciones de la flavanona naringenina, en las que se han podido obtener derivados mono-nitrados utilizando  $Co(NO_3)_2$  como agente nitrante.<sup>389</sup>

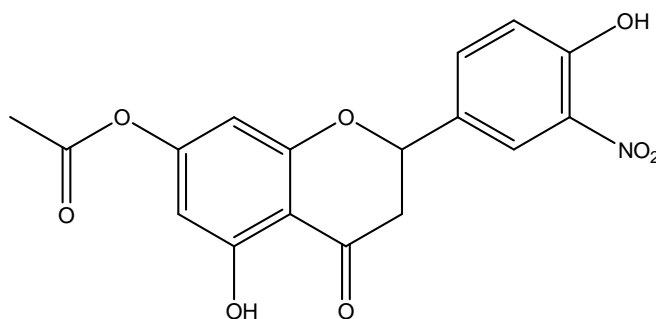
Varios nitratos inorgánicos han sido usados en presencia de ácidos minerales fuertes, para nitrar compuestos orgánicos, en particular el  $NH_4NO_3$  en presencia de  $CF_3COOH$ .<sup>385</sup> Pero tiene la desventaja de que es capaz de oxidar fenoles a quinonas.

Nitratos de metales de transición también han sido usados en presencia de ácidos minerales fuertes para nitrar compuestos orgánicos. Fue en 1925 cuando Menke<sup>386</sup> mostró que las sales nítricas de los metales de transición tales como nitrato de cobre en anhídrido acético pueden ser usadas para nitrar compuestos aromáticos.

También se ha publicado la mononitración de cumarinas, una clase de flavonoides, utilizando  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$  o  $\text{CuNO}_3$  en anhídrido acético,<sup>387</sup> lográndose una mononitración selectiva.



**Fig.28.** 3'-nitronaringenina



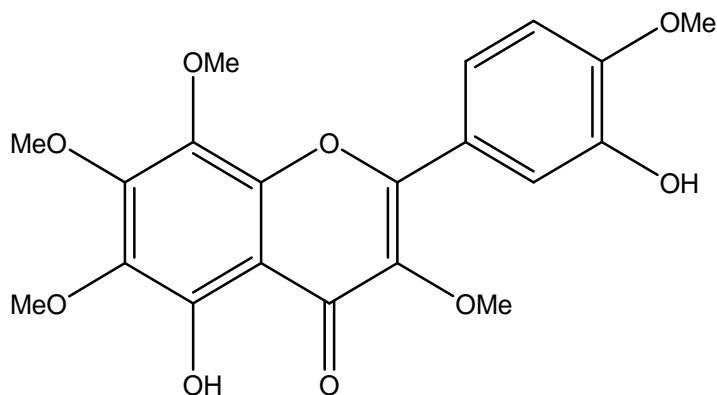
**Fig.29.** 7-acetil-3'-nitronaringenina

### 5.3 Nitro y amino-derivados con actividad citotóxica

Últimamente se han logrado sintetizar derivados nitrados y aminados utilizando flavonas polimetoxiladas, tomando como ejemplo los flavonoides del género *citrus* o *gardenia*.<sup>390</sup> Los derivados aminados han presentado gran



actividad citotóxica así como capacidad para inducir apoptosis, pero ninguno de los derivados estudiados presentaron más actividad que el compuesto natural (**Fig.30**).<sup>391</sup>



**Fig.30.** Flavona aislada de *Gardenia obtusifolia*.

## 6. CONCLUSIONES

Los flavonoides son moléculas que han sido estudiadas desde hace mucho tiempo, y a los cuales se les han atribuido un gran número de efectos farmacológicos benéficos para la salud humana, reportándose principalmente efectos anticancerígenos, antimicrobianos y cardiotónicos.

Ya desde los años 30 del siglo pasado se realizaron un gran número de investigaciones acerca de su papel en el reino vegetal, las conclusiones de estos estudios revelaron la gran importancia de estos polifenoles sobre el funcionamiento de las plantas, así como la relación que estas mantienen con su entorno biótico y abiótico. De esta manera se encontró que los flavonoides podían actuar principalmente como antioxidantes ante las radiaciones UV y el propio oxígeno producido por las plantas, además de señalizadores internos relacionados su crecimiento y reproducción.

Fue hasta la década de los 80´s cuando se comenzó a poner énfasis en su capacidad para actuar como potentes antioxidantes, principalmente *in vitro*, ya que se encontró que eran capaces de neutralizar un gran número de radicales libres al actuar como donadores de hidrogeno.

Sin embargo ha sido en la última década que se ha complementado esta visión, debido a que los flavonoides no solo actúan como antioxidantes. Ya que se ha descrito que son capaces de modular ciertos marcadores de estrés fisiológico y de inflamación, presentes en un gran número de enfermedades. A través de procesos que si bien se ha avanzado en su elucidación, sigue sin entenderse totalmente la manera exacta en como ejercen tan variados efectos. En este sentido se ha descubierto que son capaces de influenciar la modulación de la expresión de diferentes enzimas, tales como eNOS, iNOS y COX, y de inhibir la expresión de NF-kB y de la proteína C reactiva, además del factor de necrosis tumoral TNF, y un gran número de proteínas quinasas. Factores que suelen encontrarse desregulados en los procesos inflamatorios-degenerativos, provocando círculos viciosos, que se ha propuesto como base para un gran número de enfermedades. Por lo que se ha propuesto que esta gran capacidad para afectar a estos marcadores bioquímicos es la base para explicar la mayoría de los efectos terapéuticos reportados.

Por otro lado, desde el punto de vista de la síntesis de derivados de flavonoides, se puede decir que en los últimos años también se han generado diversos compuestos de diversa índole, que en su mayoría han sido halogenados, aminados o nitrados, a los cuales en su mayoría se les ha encontrado capacidad para actuar como agentes anticancerígenos. Sin embargo también se ha incursionado en el tratamiento de otro tipo de enfermedades como las neurodegenerativas.

Para complementar una visión global sobre el estudio de los flavonoides, se debe comentar que en algunas de las citas encontradas se mencionan la capacidad de los flavonoides de ejercer un efecto "tóxico" que se encuentra estrechamente ligado con la dosis manejada. En particular se señala la capacidad de algunos flavonoides de ejercer efectos prooxidantes y citotóxicos en algunos sistemas *in vitro*.

En resumen los flavonoides siguen ofreciendo la más grande gama de compuestos nutracéuticos de origen natural al alcance de la medicina, no solo por sus propiedades antioxidantes sino por su gran capacidad de modular factores degenerativos relacionados con procesos oxidativos e inflamatorios, que están presentes en la mayoría de las enfermedades. Y más aún, ya que los flavonoides ya sea por su gran variedad estructural, su prevalencia en la dieta humana, sus múltiples efectos terapéuticos, y su relativa baja toxicidad, han cobrado relevancia desde el punto de vista de la nutrigenómica, la cual toma en cuenta la influencia de los compuestos químicos que tomamos de la alimentación, sobre importantes aspectos bioquímicos humanos, y como de esta manera son capaces de intervenir en un procesos profundamente interrelacionados, que resultan en el mantenimiento de la salud humana.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Formica J. F., Regelson W., *Food Chem. Toxicol.*, **33**, 1061-1080 (1995).
2. Commenges D., Scotet V., Renaud S., Jacmind-Gadda H., Barberger- Gateau P., *Eur. J. Epidemiol.*, **16**, 357-363 (2000).
3. Judd, W. S. Campbell, C. S. Kellogg, E. A. Stevens, P.F. Donoghue, M. J. 2002. *Plant systematics: a phylogenetic approach, Second Edition*. Sinauer Assoc, USA.
4. Das DK. Naturally occurring flavonoids: structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterization. *Methods Enzymol* 1994; 234; 410-20.
5. Harborne JB. *The flavonoids: Advances in Research Since 1986*. London: Chapman and Hall; 1993.
6. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 1983; 32; 1141-8.
7. Christine A. Williams and Renée J. Grayer. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* 21,539-573. 2004.
8. El Attar TM, Virji AS. Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer growth and proliferation. *Anticancer Drugs* 1999;10:187-193
9. Bors W, Heller W, Christa M y cols. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*, 1990, 186:343-55.
10. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002; 22:19-34.
11. Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. Fruit phenolics. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990.
12. Alan Crozier, Michael E.J. Lean. Quantitative Analysis of the Flavonoids Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery. *Journal Agri. Food Chem.* 1997, 45, 590-95.
13. Arts IC, Hollman PC, Kromhout D. Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet*. 1999 Aug 7;354(9177):488.
14. Yilmaz Y, Toledo RT. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J Agric Food Chem.* 2004 Enero 28;52(2):255-60.
15. Butt MS, Sultan MT. Green tea: nature's defense against malignancies. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2009 May;49(5):463-73.
16. Shoji T, Akazome Y, Kanda T, Ikeda M. The toxicology and safety of Apple polyphenol extract. *Food Chem Toxicol.* 2004 Jun; 42(6):959-67.
17. Innocenti M, Michelozzi M, et al. Flavonoids and biflavonoids in Tuscan berries of *Juniperus communis* L.: detection and quantitation by HPLC/DAD/ESI/MS. *J Agric Food Chem.* 2007 Aug 8;55(16):6596-602.
18. Gattuso G, Barreca D et al. Flavonoid composition of Citrus juices. *Molecules.* 2007 Aug 3; 12(8): 1641-73.
19. Francisco A Tomás-Barberán et al. Flavanonas, chalcones and dihydrochalcones-nature occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 2000, 80:1073-1080.
20. Ludeña B, Mastandre C, et al. Isoflavonas en soja, contenido de daidzeína y genisteína y su importancia biológica. *Bioquímica y Patología Clínica. Asociación Bioquímica Argentina.* Vol. 71, Num.1, 2007. 54-66.
21. He J, Giusti MM. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2010; 1:163-87.
22. Pan H. et al.; *PHYTOCHEMISTRY* 42 (4) 1185 (1996).
23. Brouillard, R.; *PHYTOMHEMISTRY* 22 (6) 1311-1323 (1983).
24. De Felice S.L. Nutraceuticals: Opportunities in an Emerging Market. *Scrip Mag* 1992; 9
25. Cao J, Zhang Y, Chen W, Zhao X. The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake. *Br J Nutr* 2010; 103:249-255.
26. F.Gozzo. Systemic Acquired Resistance in Crop Protection: From Nature to a Chemical Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2003, vol 51, 4487-4503.
27. N. Ferry, M.G. Edwards, J.A. Gatehouse. Plant-Insect Interactions: Molecular Approaches to Insect Resistance. *Current Opinion in Biotechnology.* 2004, vol. 15, 155-161.
28. Brian McGonigle, Oliver Yu, Woosuk Jung, et al. Production of the Isoflavones Genistein and Daidzein in Non-Legume Dicot and Monocot Tissues. *Nutrition and Health, The DuPont Company, Experimental Station, P.O. Box 80402, Wilmington, Delaware 19880-0402.*
29. Ryan KG, Swinny EE, Markham KR, Winefield C: Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry* 2002, 59:23-32.
30. Peters, N.K., Frost, J.W. and Long, S. R. *Science.* 1986, 233, 977-980.

31. Ryan KG, Swinny EE, Winefield C, Markham KR: Flavonoid and UV photoprotection in Arabidopsis mutants. *Z Naturforsch* 2001, 56c:745-754.
32. Buer, C.S., and Muday, G.K., The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of Arabidopsis roots to gravity and light. *Plant Cell*. 2004, 16: 1191-1205.
33. Routaboul JM, Dobus C. et al. Metabolite profiling and quantitative genetics of natural variation for flavonoids in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*. 2012, Mar 22. Proximo a publicar en Pub Med.
34. Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B, Grissem W, Jones R, Eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD: *American Society of Plant Physiologists*. 2000, PP. 1250-1318.
35. Dewick PM. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 2002, 2<sup>nd</sup> ed. Chichester: Wiley.
36. Brenda Winkel-Shirley. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002, 5:218-223.
37. WHO. 2003. Diet Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases, Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, WHO Technical Report Series 916. Geneva, World Health Organization.
38. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc*. 1996. 96:1027-1039.
39. Law MR, Morris JK. By how much does fruit and vegetable consumption reduce the risk of ischemic heart disease? 1998. *Eur J Clin Nutr* 52:549-556.
40. Riboli E, Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. 2003. *Am J Clin Nutr* 78:559S-569S.
41. Indu B. Jaganath and Alan Crozier. Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. Cap 1: Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds. 2010 John Wiley and Sons, Inc. 1-49.
42. Heim K, Tagliaferro A, Bobilya D. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002.13:572-584.
43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
44. Zhang L, Ravipati AS, Koyyalamudi SR, Jeong, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing flavonoid compounds. *J. Agric. Food Chem*. 2011, Dec 14;59(23):12361-7.
45. Kamran Ghasemi, Yosef Ghasemi, et al. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci*. 2009. Vol 22 (3), 277-281.
46. Kelly L, Wolfe and Rui Hai Liu. Structure-Activity Relationships of Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay. *J. Agric. Food Chem*. 2008, 56,8404-11.
47. Han RM, Zhang JP, Skibsted LH. Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants. *Molecules*. 2012; 17(2), 2140-2160.
48. Suwan Yap, Chengxue Qin, et al. Effects of resveratrol and flavonoids on cardiovascular function: Physiological mechanisms. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, Inc. Vol 36(5).2010, 350-359.
49. David Grassi, et al. Flavonoids, Vascular Function and Cardiovascular Protection. *Current Pharmaceutical Design*. 2009, 15, 1072-1084.
50. Jonathan M Hodgson. Tea flavonoids and cardiovascular disease. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2008; 17(S1):288-290.
51. Hooper L, Kroon PA, et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008, 88(1):38-50.
52. Edward G. Miller, Jason J. Peacock, et al. Inhibition of Oral Carcinogenesis by Citrus Flavonoids. *Nutrition and Cancer*. 2008, 60(1), 69-74.
53. Jorge F.S. Ferreira, Devanand L, et al. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. *Molecules*. 2010, 15, 3135-3170.
54. Sonia Ramos. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2007 (18), 427-442.
55. Yao H, Xu W, Shi X, Zhang Z. Dietary flavonoids as cancer prevention agents. *J. Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2011; 29(1), 1-31.
56. Bautista E, Calzada F, et al. Antiprotozoal Activity of Flavonoids Isolated from *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae). *J Mex Chem Soc*. 2011, 55(4), 251-253.
57. Gilles Casano, Aurélien Dumétre, et al. Anti-HIV and antiplasmodial activity of original flavonoid derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2010, 18, 6012-6023.
58. Jorge F.S.Ferreira, et al. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. *Molecules*. 2010, 15, 3135-3170.

59. María Esther Ramírez M. et al. Mendoza J.A. Flavonoides con actividad antiprotozoaria. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2010. Vol 41(1).
60. González R, Ballester I. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011, 51(4), 331-362.
61. Hämäläinen M, Nieminen R, et al. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavones, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*. 2007. Art ID.45673.
62. Tuñón MJ, García-Mediavilla MV, et al. Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Current Drug Metabolism*. 2009. 10(3), 256-271.
63. Pan MH, Lai CS, Ho CT. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food and Function*. 2010. 1(1), 15-31.
64. Hwang SL, Shih PH, Yen GC. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem*. 2012. 1; 60(4): 877-85.
65. Gutierrez-Merino C, Lopez-Sanchez C. Neuroprotective actions of flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*. 2011; 18(8): 1195-212.
66. L.Letenneur, C. Prost-Lima. Flavonoid intake and cognitive over a 10-year period. *Am J Epidemiol*. 2007. 165(12), 1364-1371.
67. Spencer JP. Flavonoids: modulators of brain function?. *The British Journal of Nutrition*. 2008. May; 99. E Suppl 1:ES60-77.
68. Benthath A, Rusznyak S y Szent-György A: Vitamin nature flavona. *Nature*; 798. En: *Flavonoids in Health and Disease*. Ed Marcel Dekker, INC. New York, 1936, 5:137-161.
69. Ursini F, Maiorino M, Morazzoni P y cols. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Rad Biol Med*, 1994, 16:547-553.
70. Loughton MJ, Halliwell B, Evans PJ y cols. Antioxidant and prooxidant actions of the plant phenolic quercetin, gossypol and myricetin. Effect on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation, and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol*, 1989, 38:2859-286.
71. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O y Kondo K:Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Internal Medicine I, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2001, 47:357-362.
72. Terao J, Yamaguchi S, Shirai M y cols. Protection by quercetin and quercetin 3-O-beta-D-glucuronide of peroxynitrite-induced antioxidant consumption in human plasma low-density lipoprotein. *Free Radic Res*, 2001, 35:925-931.
73. Benito S, López D, Saiz MP y cols.: A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol*. 2002.135:910-916.
74. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev*.1998; 56:317-33.
75. Cao et al. 1993 *Free Radic Biol Med*. 14, 303-311.
76. Benzie and Strain. 1996. *Anal Biochem*. 239, 70,76.
77. Frei, B. et al. *Journal of Nutrition*. 2003. 133:3275S-3284S.
78. Gardner PT, McPhail DB and Duthie GG (1997). Electron spin resonance spectroscopic assessment of the antioxidant potential of teas in aqueous and organic media. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 257-262.
79. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med*. 1996. 20, 933-956.
80. Chantal G.M. Heinjnen, Guido R.M.M et al. Protection of Flavonoids Against Lipid Peroxidation: The Structure Activity Relationship Revisited. *Free Radical Research*, 2002, 36(5), 575-581.
81. Cao G, Sofic E. and Prior, R.L.Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. 1997. *Free Radic. Biol. Med*.22, 749-760.
82. Weber HA, Hodges AE, et al. Comparison of proanthocyanidins in commercial antioxidants: grape seed and pine bark extracts. 2007. *J Agric Food Chem*. 10; 55(1), 148-156.
83. Rahman A, Shahabuddin S, et al. Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen free radicals. *Carcinogenesis*. 1989; 10:1833-9.
84. Brown JE, Khodr H, et al. Structural dependence of flavonoids interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J*. 1998.330, 1173-1178.



85. Chantal G.M. Heijnen, Guido R.M.M., et al. Protection of Flavonoids Against Lipid Peroxidation: The Structure Activity Relationship Revisited. 2001. *Free Radical Research*, 36(5), 575-581.
86. Van Acker, S.A.B.E., et al. Structural aspects of the antioxidant activity of flavonoids. 1996. *Free Radic Biol Med*. 20, 331-342.
87. Haenen, G.R.M.M., Jansen, F.P. and Bast, A. The antioxidant properties of five *O*-( $\beta$ -hydroxyethyl)-rutosides of the flavonoid mixture Venoruton. *Phlebology Suppl*. 1993(1), 10-17.
88. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342(8878): 1007-11.
89. Hertog MG, Kromhout D, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*. 1995;155(4): 381-386.
90. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 2005, 81(1), 317S-325S.
91. Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res*. 2003; 93:388-398.
92. Hare JM. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:719-29.
93. Schulz R, Rassaf T, Massion PB, et al. Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther*. 2005;108:225-56.
94. Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol*. 1993; 265(2Pt 2):H774-778.
95. Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Ricci T, Jantzen P, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995; 26(1): 90-5.
96. Karim M, McCormick K, Kappagoda CT. Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr* 2000;130(8S Suppl): 2105S-8S.
97. Lorenz M, Wessler S, Follmann E, Michaelis W, et al. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, CAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem*. 2004; 13; 279(7): 6190-5.
98. Benito S, Lopez D, Saiz MP, et al. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol*. 2002; 135(4): 910-6.
99. Nicholas K.H. Khoo, C.Roger White, Lucas Pozzo-Miller, et al. Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010(49). 339-347.
100. Victoria García-Mediavilla, Irene Crespo, Pilar S. Collado, et al. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*. 2007(557), 221-229.
101. Leeuwenburgh, C., Hardy M.M., et al. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. 1997. *J Biol Chem*. 272, 1433-1436.
102. Moore K.P., Darley-Usmar V. et al. Formation of F2-isoprostanes during oxidation of human low-density lipoprotein and plasma by peroxynitrite. *Circ Res*, 1995(77), 335-341.
103. Huk I, Brovkovich V, Nanobash Vili J, Weigel G, et al. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br J Surg*. 1998. 85(8), 1080-5.
104. Van Acker SA, Tromp MN, et al. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995. 214(3), 755-9.
105. Choi JS, Chung HY, Kang SS, et al. The structure-activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxynitrite. *Phytother Res*. 2002. 16(3), 232-5.
106. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hooft DE, et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*. 2001. 74(4), 418-425.
107. Thomas S.R., Witting P.K, et al. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal*. 2008(10), 1713-1765.
108. Viana M, Barbas C, Bonet B, et al. In vitro effects of a flavonoid-rich extract on LDL oxidation. *Atherosclerosis*. 1996, 123(1-2):83-91.
109. Briante R, Febbraio F, Nucci R. Antioxidant/prooxidant effects of dietary non-flavonoid phenols on the Cu<sup>2+</sup>-induced oxidation of human low-density lipoprotein (LDL). *Chem Biodivers*. 2004,1(11):1716-29.

110. Reed J. Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health. *Crit rev Food Sci Nutr.* 2002, 42(3 Suppl):301-16.
111. Wang D, Zhuang Y, et al. Study of the effects of total flavonoids of Astragalus on atherosclerosis formation and potential mechanisms. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:282383. Epub 2012 Jan 29.
112. Chanet A, Milenkovic D, et al. Naringenin, the major grapefruit flavonoid, specifically affects atherosclerosis development in diet-induced hypercholesterolemia in mice. *J Nutr Biochem.* 2012. 23(5), 469-77.
113. Guerrero J.A. Lozano M.L. Castillo J, et al. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *J Thromb. Haemost.* 2005 (3). 369-376.
114. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004, 79(5). 727-47.
115. Erdman JW Jr, Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, et al. Flavonoids and health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *J Nutr.* 2007. 137(3 Suppl 1): 718S-737S.
116. Pignatelli P, Di Santo S, Buchetti B, Sanguigni V, Bruneli A, Violi F. Polyphenols enhance platelet nitric oxide inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J* 2006; 20:1082-1089.
117. Sang-Haare B, Tae-Sook JG, Han-Ik Ch, DougSoon L. Flavonoids derived from citrus as collagen-induced platelet aggregation inhibitor. Patent No.US 2,221,357 B1.24 de Abril 2001.
118. Mc Gregor L, Bellangeon M, Chignier E, Lerond L, Rouselle C. Effect of micronized purified flavonoid fraction on in vivo platelet functions in rats. *Tromb Res* 1999(94). 236-40.
119. Duarte J, Perez Vizcaino F, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol.* 1993(24), 857-862.
120. Jeon S.B., Kim G, Kim J.L., Seok Y.M., et al. Flavone inhibits vascular contraction by decreasing phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007(34), 1116-1120.
121. Xu Y.C., Leung S.W., Yeung D.K., Hu L.H., Chen G.H., et al. Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry.* 2007(68), 1179-1188.
122. Dong X, Liu T, Yan J, et al. Synthesis, biological evaluation and quantitative structure-activities relationship of flavonoids as vasorelaxant agents. *Bioorg Med Chem.* 2009(17), 716-726.
123. Mishra S.K, Abbot S.E., Choudhury Z, et al. Endothelium-dependent relaxation of rat aorta and main pulmonary artery by the phytoestrogens genistein and daidzein. *Cardiovasc Res.* 2000(46), 539-546.
124. Hodgson J.M., Effects of tea and tea flavonoids on endothelial function and blood pressure: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006(33), 838-41.
125. Hodgson J.M. Bruke V, Puddey I.B. Acute effects of tea on fasting and postprandial vascular function and blood pressure in humans. *J Hypertens.* 2005(23), 47-54.
126. Taubert D, Roesen R, Schomig E. Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2007(167), 626-34.
127. Catherine A. Rice-Evans and Lester Packer. Flavonoids in Health and Disease. 2003. Second Ed. Marcel Dekker, Inc. Cap. 7. 175-177.
128. Mackness M, Arrol S, Abbott C, Durrington P.N. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis.* 1993(104), 129-135.
129. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier C.L., Newton R.S., Primo-Parmo S.L., La Du B.N. Paraonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 1998(101), 1581-1590.
130. Lee J, Cho HS, Kim DY, Cho JY, Chung JS, Lee HK, et al. Combined effects exercise and soy isoflavona diet on paraoxonase, nitric oxide and aortic apoptosis in ovariectomized rats. *Appetite.* 2012, 58(2), 462-9.
131. Diepgen L, Geldmacher V, Mallinckrodt M. Interethnic differences in the detoxication of organophosphates: the human serum paraoxonase polymorphism. *Arch Toxicol.* 1986. S9, 154-8.
132. Ellis RJ, Olichney JM, Thal LJ, et al. Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, part XV. *Neurology.* 1996(46), 1502-6.
133. Paragh G, Balla P, Katona E. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2002(252), 63-7.
134. Hunstein W. Epigallocatechin-3-gallate in AL amiloidosis: a new therapeutic option?. *Blood.* 2007, 110(6), 2216.
135. Mereles D, Wanker EE, Katus HA. Therapy effects of green tea in a patient with systemic light-chain amiloidosis. *Clin Res Cardiol.* 2008(5), 97, 341-344.
136. Schoeter H, Williams RJ, Matin R, Rice-Evans CA. Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med.* 29:1222-1233;2000



137. Shi YQ, Fukai T, Sakagami H, et al. Cytotoxic flavonoids with isoprenoid groups from *Morus mogolica*. *J Nat Prod.* 2001(64), 181-188.
138. Fukai T, Sakagami H, Toguchi M, Takayama F, et al. Cytotoxic activity of low molecular weight polyphenols against human oral tumor cell lines. *Anticancer Res.* 2000(20), 2525-2536.
139. Sakagami H, Jiang Y, Kusama K, Atsumi T, et al. Induction of apoptosis by flavones, flavonols (3-hydroxyflavones) and isoprenoid-substituted flavonoids in human oral tumor cell lines. *Anticancer Res.* 2000(20), 271-277.
140. Elattar TM, Virji AS. Effect of tea polyphenols on growth of oral squamous carcinoma cells in vitro. *Anticancer Res.* 2000(20), 3459-3465.
141. Elattar TM, Virji AS. The inhibitory effect of curcumin, genisteína, quercetin and cisplatin on the growth of oral cancer cells in vitro. *Anticancer Res.* 2000(20), 1733-1738.
142. Pouget C, Lauthier F, Simon A, Fagnere C, Basly JP, Delage C, et al. Flavonoids: Structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001(11), 3095-3097.
143. Han D, Tacgibana H, Yamada K. Inhibition of environmental estrogen-induced proliferation of human breast carcinoma MCF-7 cells by flavonoids. *In vitro Cell Dev Biol Anim.* 2001(37), 275-282.
144. Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO). *Anticancer Res.* 1999(19), 4297-4303.
145. Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines. *Thyroid.* 1999(9), 369-376.
146. Bai F, Matsui T, Ohtani-Fujita N, et al. Promoter activation and following induction of the p21/WAF1 gene by flavone is involved in G1 phase arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.* 1998; 437, 61-64.
147. Caltagirone S, Ranelletti FO, Rinelli A, Maggiano N, et al. Interaction with type II estrogen binding sites and antiproliferative activity of tamoxifen and quercetin in human non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997; 17:51-59.
148. Knowles LM, Ziggrossi DA, Tauber RA, Hightower C, Milner JA. Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation. *Nutr Cancer.* 2000(38), 116-122.
149. Bhatia N, Agarwal R. Detrimental effect of cancer preventive phytochemicals silymarin, genistein and epigallocatechin 3-gallate on epigenetic events in human prostate carcinoma DU145 cells. *Prostate.* 2001;46:98-107.
150. Kampa M, Hatzoglou A, Notas G, et al. Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer.* 2000;37:223-233.
151. Agarwal R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem Pharmacol.* 2000; 60:1051-1059.
152. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000; 60:3823-3831.
153. Kamei H, Hashimoto Y, Koide T, Kojima T, Hasegawa M. Anti-tumor effect of methanol extracts from red and white wines. *Cancer Biother Radiopharm.* 1998; 13:447-452.
154. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr.* 1999; 38:133-142.
155. Kou SM, Morehouse HF, Jr., Lin CP. Effect of antiproliferative flavonoids on ascorbic acid accumulation in human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Lett.* 1997; 116:131-137.
156. Kou SM. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 1996; 110:41-48.
157. Wang IK, LIN-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenina and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukemia HL-60 cells. *Eur J Cancer.* 1999; 35:1517-1525.
158. Chung HS, Chang LC, Lee SK, Shamon LA, et al. Flavonoid constituents of *Chorizanthe diffusa* with potential cancer chemopreventive activity. *J Agric Food Chem.* 1999; 47:36-41.
159. Csokay B, Prajda N, Weber G, Olah E. Molecular Mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci.* 1997; 60:2157-2163.
160. De Vincenzo R, Ferlini C, Distefano M, Gaggini C, Riva A, Bombardelli E, et al. In vitro evaluation of newly developed chalcone analogues in human cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000; 46:305-312.
161. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 2010; 38:96-109.
162. Oyagbemi AA, Azeez OI, Saba AB. Interactions between reactive oxygen species and cancer: The roles of natural dietary antioxidants and their molecular mechanisms of action. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2009; 10:535-544.
163. Balsano C, Alisi A. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. *Curr Pharm Des.* 2009; 15:3063-3073.

164. Park IJ, Lee YK, Hwang JT, Kwon DY, Ha J, Park OJ. Green tea catechin controls apoptosis in colon cancer cells by attenuation of H2O2-stimulated COX-2 expression via the AMPK signaling pathway at low-dose H2O2. *Ann NY Acad Sci.*2009; 1171:538-544.
165. Lu W, Ogasawara MA, Huang P. Models of reactive oxygen species in cancer. *Drug Discov Today Dis Models.*2007; 4:67-73.
166. Ambrosone CB. Oxidants and antioxidants in breast cancer. *Antioxidant Redox Signal.*2000;2:903-917.
167. Wells PG, McCallum GP, Chen CS, Henderson JT, Lee CJ, Perstin J, Preston TJ, Wiley MJ, Wong AW, Oxidative stress in developmental origins of disease: Teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol Sci.* 2009; 108:4-18.
168. Kim JS, Ahn KJ, Kim JA, Kim HM, Lee JD, Lee JM, Kim SJ, Park JH. Role of reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysregulation in 3-bromopyruvate induced cell death in hepatoma cells: ROS-mediated cell death by 3-BrPA. *J Bioenerg Biomembr.*2008; 40:607-618.
169. Mena S, Ortega A, Estela JM. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat Res.*2009; 674:36-44.
170. Klauning JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol.*2010; 38:96-109.
171. Shih PH, Yeh CT, Yen GC. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J Agric Food Chem.*2007; 55:9427-9435.
172. Chan R, Lok K, Woo J. Prostate cancer and vegetable consumption. *Mol Nutr Food Res.*2009; 53:201-216.
173. Nothlings U, Murphy SP, Wilkens LR, Boeing H, Schulze MB, Bueno-de-Mesquita HB, Michaud DS, Roddam A, Rohrmann S, Tjonneland A, Clavel-Chpelon F, Trichopoulou A, Sieri S, Rodriguez L, Ye W, Jenab M, Kolonel LN. A food pattern that is predictive of flavonol intake and risk of pancreatic cancer. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88:1653-1662.
174. Sun J, Liu RH. Apple phytochemical extracts inhibit proliferation of estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells through cell cycle modulation. *J Agric Food Chem.*2008; 56:11661-11667.
175. Thiebaut AC, Chajes V, Gerber M, Boutron-Ruault MC, Joulin V, Lenoir G, Berrino F, Riboli E, Benichou J, Clavel-Chapelon F. Dietary intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of breast cancer. *Int J Cancer.*2009; 124:924-931.
176. Gerhauser C. Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. *Planta Med.*2008; 74:1608-1624.
177. Spormann TM, Albert FW, Rath T, Dietrich H, Will F, Stockis JP, Eisenbrand G, Janzowski C. Anthocyanidin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17:3372-3380.
178. Haleagrahara N, Radhakrishnan A, Lee N, Kumar P. Flavonoid quercetin protects against swimming stress-induced changes in oxidative biomarkers in the hypothalamus of rats. *Eur J Pharmacol.*2009; 621:46-52.
179. Antosiewicz J, Ziolkowski W, Kar S, Powolny AA, Singh SC. Role of reactive oxygen intermediates in cellular responses to dietary cancer chemopreventive agents. *Planta Med.*2008; 74:1570-1579.
180. Chen HM, Wu YC, Chia YC, Chang FR, Hsu HK, Hsieh YC, et al. Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. *Cancer Lett.*2009; 286:161-171.
181. Li W, Nie S, Yu Q, Xie M. (-)- Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis of human hepatoma cells by mitochondrial pathways related to reactive oxygen species. *J Agric Food Chem.*2009; 57:6685-6691.
182. Azam S., Hadi N, Khan NU, Hadi SM. 2004. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol In Vitro.*; 18(5):555-61.
183. Hong J, Lu H, Meng X, Ryu JH, Hara Y, Yang CS. Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 2002.15; 62(24):7241-6.
184. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature.*2000;407:796-801.
185. Kumar N, Shibata D, Helm J, Coppola D, Malafa M. Green tea polyphenols in the prevention of colon cancer. *Front Biosci.*2007; 12:2309-2315.
186. Jagtap S, Meganathan K, Wagh V, Winkler J, Hescheler J, Sachinidis A. Chemoprotective mechanism of the natural compounds, epigallocatechin-3-O-gallate, quercetin and curcumin against cancer and cardiovascular diseases. *Curr Med Chem.*2009; 16:1451-1462.
187. Harper CE, Patel BB, Wang J, Eltoum LA, Lamartiniere CA. Epigallocatechin-3-Gallate suppresses early stage, but not late stage prostate cancer in TRAMP mice: Mechanisms of action. *Prostate.* 2007; 67:1576-1589.

188. Du Y, Gou H, Lou H. Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *J Agric Food Chem.* 2007; 55:1695-1701.
189. Teiten MH, Gaascht F, Eifes S, Dicato M, Diederich M. Chemopreventive potential of cucumin in prostate cancer. *Genes Nutr.* 2010; 5:61-74.
190. Pierini R, Kroon PA, Guyot S, Ivory K, Johnson IT, Belshaw NJ. Procyanidin effects on oesophageal adenocarcinoma cells strongly depend on flavan-3-ol degree of polymerization. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52:1399-1407.
191. Shukla S, Gupta S. Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44:1833-1845.
192. Szliszka E, Czuba ZP, Jernas K, Krol W. Dietary Flavonoids Sensitive HeLa Cells to Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). *Int J Mol Sci.* 2008; 9:56-64.
193. Wu YX, Fang X. Apigenin, chrysin, and luteolin selectively inhibit chymotrypsin-like and trypsin-like proteasome catalytic activities in tumor cells. *Planta Med.* 76:128-132.
194. Meeran SM, Katiyar SK. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Front Biosci.* 2008; 13:2191-2202.
195. Ouyang G, Yao L, Ruan K, Song G, Mao Y, Bao S. Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of human ovarian cancer cells via activation of DNA damage checkpoint pathways. *Cell Biol Int.* 2009;33:1237-1244.
196. Chatelain K, Phippen S, McCabe J, Teeters CA, O'Malley S, Kingsley K. Cranberry and grape seed extracts inhibit the proliferative phenotype of oral squamous cell carcinomas. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008.
197. Kaur M, Mandair R, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma cells. *Nutr Cancer.* 2008;60 Suppl 1:2-11.
198. Huang CH, Tsai SJ, Wang YJ, Pan MH, Kao JY, Way TD. EGCG inhibits protein synthesis, lipogenesis, and cell cycle progression through activation of AMPK in p53 positive and negative human hepatoma cells. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53:1156-1165.
199. Zhang Q, Zhao XH, Wang ZJ. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis. *Toxicol In Vitro.* 2009;23:797-807.
200. Menakuru SR, Brown NJ, Staton CA, Reed MW. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Br J Cancer.* 2008;99:1961-1966.
201. Yao H, Wang H, Zhang Z, Jiang BH, Luo J, Shi X. Sulforaphane inhibited expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in human tongue squamous cancer cells and prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 2008;123:1255-1261.
202. Akhtar S, Meeran SM, Katiyar N, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit the growth of human non-small cell lung cancer xenografts by targeting insulin-like growth factor binding protein-3, tumor cell proliferation, and angiogenic factors. *Clin Cancer Res.* 2009;15:821-831.
203. Jackson SJ, Venema RC. Quercetin inhibits eNOS, microtubule polymerization, and mitotic progression in bovine aortic endothelial cells. *J Nutr.* 2006; 136:1178-1184.
204. Fang J, Xia C, Cao Z, Zheng JZ, Reed E, Jiang BH. Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. *FASEB J.* 2005; 19:342-353.
205. Berge G, Ovrebo S, Eilertsen E, Haugen A, Mollerup S. Analysis of resveratrol as a lung cancer chemopreventive agent in A/J mice exposed to benzo[a]pyrene. *Br J Cancer.* 2004;91:1380-1383.
206. Holy J. Curcumin inhibits cell motility and alters microfilament organization and function in prostate cancer cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2004; 58:253-268.
207. Sogno I, Vannini N, Lorusso G, Cammarota R, Noonan DM, Generoso L, Sporn MB, Albini A. Anti-angiogenic activity of a novel class of chemopreventive compounds: Oleanic acid terpenoids. *Recent Results Cancer Res.* 2009;181:209-212.
208. Grothey A, Galanis E. Targeting angiogenesis: Progress with anti-VEGF treatment with large molecules. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009; 6:507-518.
209. Park JH, Yoon JH, Kim SA, Ahn SG. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits invasion and migration of salivary gland adenocarcinoma cells. *Oncol Rep.* 2010; 23:585-590.
210. Fang J, Zhou Q, Liu LZ, Xia C, Hu X, Shi X, Jiang BH. Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1alpha and VEGF expression. *Carcinogenesis.* 2007;28:858-864.

211. Wen W, Lu J, Zhang K, Chen S. Grape seed extract inhibits angiogenesis via suppression of the vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2008;1:554-561.
212. Kwon KH, Barve A, Yu S, Huang MT, Kong AN. Cancer chemoprevention by phytochemicals: Potential molecular targets, biomarkers and animal models. *Acta Pharmacol Sin*. 2007;28:1409-1421.
213. Cheung KL, Khor TO, Huang MT, Kong AN. Differential in vivo mechanism of chemoprevention of tumor formation in azoxymethane/dextran sodium sulfate mice by PEITC and DBM. *Carcinogenesis*. 2010;31:880-885.
214. Sun B and Karin M. NF-kappaB signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene*. 2008(27), 6228-6244.
215. Wong, CM and Ng IO. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2008(28), 160-174.
216. Fabregat I, Roncero C, and Frenandez M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int*. 2007(27), 155-162.
217. Katula KS, McCain JA, Radewicz AT. Relative ability of dietary compounds to modulate nuclear factor-kappaB activity as assessed in a cell-based reporter system. *J Med Food*. 2005;8:269-274.
218. Chung WG, Miranda CL, Stevens JF, Maier CS. Hop proanthocyanidins induce apoptosis, protein carbonylation, and cytoskeleton disorganization in human colorectal adenocarcinoma cells via reactive oxygen species. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:827-836.
219. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. (1999). «The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine.». *Structure* 7 (2): pp. 169-77.
220. Hla T, Neilson K (August 1992). «Human cyclooxygenase-2 cDNA». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (16): pp. 7384-8.
221. Tunon MJ, Garcia-Mediavilla MV, Sanchez-Campos S, Gonzalez-Gallego J. Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: Modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Curr Drug Metab*. 2009;10:256-271.
222. Wang S, DeGroof VL, Clinton SK. Tomato and soy polyphenols reduce insulin-like growth factor-I-stimulated prostate cancer cell proliferation and apoptotic resistance in vitro via inhibition of intracellular signaling pathways involving tyrosine kinase. *J Nutr*. 2003(133), 2367-2376.
223. Neuhauser M.L., et al. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutr Cancer*. 2004,50(1):1-7.
224. Katiyar SK, Elmets CA. Green tea polyphenols antioxidants and skin photoprotection. *Int. J. Oncol* 2001; 18:1307-13.
225. Yang, C.S., P.Maliakal and X.Meng. Inhibition in carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:25-54.
226. Edward G. Miller, Jason J. Peacock, T. Campbell Bourland, Samuel E. Taylor; and John M. Wright. Inhibition of Oral Carcinogenesis by Citrus Flavonoids. *Nutrition and Cancer*. 2008, 60(1),69-74.
227. Lam KH, Alex D, Lam IK, Tsui SK, Yang ZF, Lee SM. Nobiletin, a polymethoxylated flavonoid from citrus, shows anti-angiogenic activity in a zebrafish in vivo model and HUVEC in vitro model. *J Cell Biochem*. 2011, 112(11): 3313-21.
228. Morr  DJ, Chueh PJ, Yagiz K, Balicki A, Kim C, Morr  DM. ECTO-NOX target for the anticancer isoflavene phenoxodiol. *Oncol Res*. 2007;16(7):229-312.
229. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00382811?term=phenoxodiol&rank=1>
230. <http://www.meipharma.com/our-programs/nadh-oxidase-inhibitors>
231. Senderowicz AM. Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest New Drugs*. 1999;17(3):313-20.
232. Sato S, Kajiyama Y, Sugano M, Iwanuma Y, et al. Alvocidib (Flavopiridol) suppresses tumor growth in SCID mice with human esophageal cancer xenografts without inducing apoptosis. *Surg Oncol*. 2006; 15(2):107-113.
233. Adriana Albini, Raffaella Dell'Eva, Roberta Ven , et al. Mechanism of the antiangiogenic activity by the hop flavonoid xanthohumol: NF-kB and Akt as targets. *The FASEB Journal*. FJ express. 2005.527-9.  
<http://www.fasebj.org/content/20/3/527.full.pdf>
234. Roberto Benelli, Roberta Ven , Monica Ciarlo, et al. The AKT/NF-kB inhibitor xanthohumol is a potent anti-lymphocytic leukemia drug overcoming chemoresistance and cell infiltration. *Biochemical Pharmacology*. 2012(83), 1634-1642.
235. Infectious Diseases Society of America. Statement of the IDSA concerning 'Bioshield II: Responding to an ever-changing threat'. Alexandria, VA: IDSA; 2004.
236. Adock H. Pharmageddon: is too late to tackle growing resistance to anti-infectives? *Pharm J*. 2002; 269:599-600.
237. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*. 1983; 32:1141-8.



238. Tereschuk ML, Riera MV, Castro GR, Abdala LR. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *J Ethnopharmacol.*1997; 56:227-32.
239. The Bible, Jeremias 8:22; Jeremias 46:11; Jeremias 51:8.
240. Fearnley J. Bee propolis. London, UK: Souvenir Press Ltd.; 2001.
241. Bosio K, Avanzini C, D'Avolio A, Ozino O, Savoia D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett Appl Microbiol.*2000; 31:174-7.
242. Hegazi AG, Abd El Hady FK, Abd Allah FA. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch(c).*2000; 55:70-5.
243. Pepelnjak S, Jalsenjak I, Maysinger D. Growth inhibition of *Bacillus subtilis* and composition of various propolis extracts. *Pharmazie.*1982; 37:864-5.
244. Dall'Agno R, Ferraz A, Bernardi AP, et al. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine.* 2003; 10:511-6.
245. El-Abyad MS, Morsi NM, Zaki DA, Shaaban MT. Preliminary screening of some Egyptian weeds for antimicrobial activity. *Microbios.*1990; 62:47-57.
246. Ohemeng KA, Schwender CF, Fu JP, Barret JF. DNA gyrase inhibitor and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorg Med Chem Lett.*1993; 3:225-30.
247. Sato Y, Suzuki S, Nishikawa T, Kihara M, Shibata H, Higuti T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.*2000; 72:483-8.
248. Pepelnjak S, Kosalec I. Galangin express bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus spp.* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.*2004; 240:111-6.
249. Fuki H, Goto K, Tabata M. Two antimicrobial flavanones from the leaves of *Glycyrrhiza glabra*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).*1988; 36:4174-6.
250. Vijaka K, Ananthan S. Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs. *Indian J Pharm Sci.*1996; 58:191-3.
251. Dastidar SG, Manna A, Kumar KA, et al. Studies on the antibacterial potentiality of isoflavonoids. *Int J Antimicrob Agents.*2004; 23:99-102.
252. Mori A, Nishino C, Enoki N, Tawata S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry.*1987;26:2231-4.
253. Hilliard JJ, Krause HM, Berstein JI, et al. A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Adv Exp Med Biol.*1995;390:59-69.
254. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res.* 1997;152:239-46.
255. Ramírez M, Mendoza JA, Arreola R, Ordaz C. Flavonoides con actividad antiprotozoaria. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.*2010;41:1.
256. Afaloyan AJ, Meyer JJ. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *J Ethnopharmacol.*1997; 57:177-81.
257. Parment S. Malaria. *Journal of the American Medical Association.*2007, 297(20):2310.
258. Phillipson JD, Wright CW. Antiprotozoal agents from plants sources. *Planta medica.*1991.57(7):53-59.
259. Ngameni B, Watcheueng J, Fekam BF, Keumedjio F, et al. Antimalarial prenylated chalcones from twigs of *Dorstenia barteri* var. *ARKIVOK*, 13:116-123.
260. Li R, Kenyon GL, Cohen FE, Chen X, Gong B, et al. *In vitro* antimalarial activity of chalcones and their derivatives. *Journal of Medicine Chemistry.*1995.38 (26):5031-5037.
261. Lehane A, Saliba K. Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite. *BMC Res. Notes.*2008,1, 26.
262. Pradeep R Patil, Sandra Gemma, Giusepp Campiani and Alister G Craig. Broad inhibition of plasmodium falciparum. *Malaria Journal.*2011,10:348. <http://www.malariajournal.com/content/10/1/348>
263. Kayser O, Kiderlen AF. In vitro leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. *Phytotherapy Research.*2001, 15(2):148-152.
264. Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: In vitro, in vivo, structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2006.50 ;(4):1352-1364.
265. Ercil D, Kaloga M, Radtke OA, Sakar MK, et al. O-gallyl flavonoids from *Geranium pyrenaicum* and their in vitro antileishmanial activity. *Turkish Journal of Chemistry.*2005.29 (4):437-443.
266. WHO, Human African Trypanosomiasis. Annual number of cases reported to WHO, 2000-2007. ([http://www.who.int/trypanosomiasis\\_african/disease/en/](http://www.who.int/trypanosomiasis_african/disease/en/)).

267. Paveto C, Gueida MM, Torres HN. Anti-trypanosoma cruzi activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48 (1):69-74.
268. Nour AM, Khalid SA, Kaiser M, Brun R, Abdalla WE, Schmidt TJ. The antiprotozoal activity of methylated flavonoids from *Ageratum conyzoides* L. *J Ethnopharmacol*. 2010;129 (1), 127-30.
269. Harbone JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000;55:481-504.
270. Wachter GA, Hoffmann JJ, Furbacher T, Blake ME, Timmermann BN. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry*. 1999; 52:1469-71.
271. Valsaaraj R, Pushpangadan P, Smitt UW, et al. New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*. *J Nat Prod*. 1997; 60:739-42.
272. Zheng WF, Tan RX, Yang L, Liu ZL. Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta Med*. 1996; 62:160-2.
273. Cafarchia C, De Laurentis N, Milillo MA, Losacco V, Puccini V. Antifungal activity of Apulia región propolis. *Parasitologia*. 1999; 41:587-90.
274. Li BQ, Fu T, Dongyan Y, Mikovits JA, et al. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000. 276; 534-8.
275. Li BQ, Fu T, Yan YD, Baylor NW, et al. Inhibition of HIV infection by baicalin-a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. *Cell Mol Biol Res*. 1993; 39:119-24.
276. Ono K, Nakane H, Fukushima M, Chermann JC, Barre-Sinoussi F. Inhibition of reverse transcriptase activity by a flavonoid compound, 5,6,7-trihydroxiflavone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 160:982-7.
277. Lin YM, Anderson H, Flavin MT, et al. In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. *J Nat Prod*. 1997; 60:884-8.
278. Moore PS, Pizza C. Observations on the inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by catechins. *Biochem J*. 1992; 228:717-9.
279. Critchfield JW, Butera ST, Folks TM. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996; 12:39-46.
280. Hu CQ, Chen K, Shi Q, et al. Anti AIDS agents, 10. Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrsanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids. *J Nat Prod*. 1994; 57:42-51.
281. Li S, Hattori T, Kodman EN. Epigallocatechin gallate inhibits the HIV reverse transcription step. *Antivir Chem Chemother*. 2011;21(6):239-43
282. Middleton Jr E, Chithan K. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harbone JB, editor. *The flavonoids: advances in research since 1986*. London, UK: Chapman and Hall; 1993.
283. Selway JWT. Antiviral activity of flavones and flavans. In: Cody V, Middleton E, Harbone JB, editors. *Plant flavonoids biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships*. New York, NY: Alan R. Liss, Inc.; 1986.
284. Jiang F, Chen W, Yi K, et al. The evaluation of catechins that contain a galloyl moiety as potential HIV-1 integrase inhibitors. *Clin Immunol*. 2010. 137(3):347-56.
285. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. Quantitation of flavonoid constituents in Citrus fruits. *J Agric Food Chem*. 1999;47:3565-71.
286. Sema Bhagwat, David B. Haytowitz and Joanne M. Holden. *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods*. Release 3. 2011.
287. So FV, Guthrie N, Chambers AF, Moussa M, and Carroll KK: Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr Cancer*. 1996, 26, 167-181.
288. Kanno S, Tomizawa A, Hiura T, Osani Y, Shouji A, et al.: Inhibitory effects of naringenina on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol Pharm Bull*. 2005, 28, 527-530.
289. Bao-dui Wang, Zheng-Yin Yang, Qin Wang, Ti-kuan Cai and Patrick Crewdson. Synthesis, characterization, cytotoxic activities, and DNA-binding properties of the La(III) complex with Naringenin Schiff-base. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2006 (14), 1880-1888.
290. Yamamoto M, Patel NA, Taggart J, Sridhar R, Cooper DR: A shift from normal to high glucosa levels stimulates cell proliferation in drug sensitive MCF-7 breast cáncer cells but not in multidrog resistant MCF-7/ADR cells which overproduce PKC- $\beta$ II. *Int J Cancer*. 1999(83),98-106.
291. Okumura M, Yamamoto M, Sakuma H, Kojima T, Muruyama T, Jamali M, et al. Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cáncer cells: reciprocal involvement of PKC- $\alpha$  and PPAR expression. *Biochim Biophys Acta* 1592:2002, 107-116.

292. Park JB: Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 260:568-574.
293. Harmon AW, Patel YP: Naringenin inhibits phosphoinositide 3-kinase activity and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305:229-234.
294. Anne W, Harmon and Yashomati M. Patel. Naringenin inhibits glucose uptake in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism for impaired cellular proliferation. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2004(85), 103-110.
295. Witak DT and DR Feller. *Anti-Lipidemic Drugs: Medicinal, Chemical and Biochemical Aspects.* Elsevier. 1991, 159-195.
296. Song-Hae Bok, et al. Naringin and naringenina as inhibitors of acyl CoA-cholesterol-o-acyltransferase. Patent Number 6,165,984. Dec. 26, 2000.
297. Mi-Kyung Lee, Surk-Sik Moon, Seung-Eun Lee, Song-Hae Bok, et al. Naringenin 7-O-cetyl Ether as Inhibitor of HMG-CoA Reductase and Modulator of Plasma and Hepatic Lipids in High Cholesterol-Fed Rats. *Bioorganic and medicinal Chemistry.* 2003 (11), 393-398.
298. Song-Hae Bok, Tae-Sook JG, Han-Ik Ch, Doug Soon L. Flavonoids derived from citrus as collagen-induced platelet aggregation inhibitor. Patente No. US 6,221,357 B1. 24 de Abril 2001.
299. Lee SH, Park YB, Bae KH, Bok SH, Kwon YK, Lee ES, Choi MS. Cholesterol-lowering activity of naringenina via inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase in rats. *Ann Nutr Metab.* 1999;43:173-180.
300. Allister EM, Borradaile NM, Edwards JY, Huff MW. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein expression and apolipoproteína B100 secretion by the citrus flavonoid naringenina and by insulin involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in hepatocytes. *Diabetes.* 2005;54:1676-1683.
301. Allister EM, Mulvihill EE, Barrett PH, Edwards JY, Carter LP, Huff MW. Inhibition of apoB secretion from HepG2 cells by insulin is amplified by naringenina, independent of the insulin receptor. *J Lipid Res.* 2008; 49:2218-2229.
302. Borradaile NM, de Dreu LE, Huff MW. Inhibition of net HepG2 cell apolipoprotein B secretion by the citrus flavonoid naringenin involves activation of phosphatidylinositol 3-kinase, independent of insulin receptor substrate-1 phosphorylation. *Diabetes.* 2003;52:2554-61.
303. Mulvihill EE, Alister EM, Sutherland BG, Telford DE, Sawyez CG, Edwards JY, Markle JM, Hegele RA, Huff MW. Naringenin prevents dislipidemia, apolipoproteína B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes.* 2009;58:2198-2210.
304. Erin E. Mulvihill, Julia M. Assini, Brian G. Sutherland, et al. Naringenin Decreases Progression of Atherosclerosis by Improving Dyslipidemia in High-Fat-Fed Low-Density Lipoprotein Receptor-Null Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010, 30:742-748.
305. Yaakov Nahmias, Jonathan Goldwasser, Monica Casali, Daan van Poll, et al. Apolipoprotein B-Dependent Hepatitis C Virus Secretion Is Inhibited by the Grapefruit Flavonoid Naringenin. *Hepatology* 2008;47:1437-1445.
306. Cao J, Zhang Y, Chen W, Zhao X. The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoid and their ordinary dietary intake. *Br J Nutr.* 2010;103:249-255.
307. Egert S, Bosy-Westphal A, Seiberl J et al. Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidized low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr.* 2009;102:1065-1074.
308. Jin F, Nieman DC, Shaneley RA, et al. The variable plasma quercetin response to 12-week quercetin supplementation in humans. *Eur J Clin Nutr.* 2010;64:692-697.
309. Meyers KJ, Rudolf JL, Mitchell AE. Influence of dietary status in mice. *J Agric Food Chem.* 2008;56:830-836.
310. Annapurana A, Reddy CS, Akondi RB, Rao SR. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol.* 2009;61:1365-1374.
311. Hwang IK, Lee CH, Yoo KY, et al. Neuroprotective effects of onion extract and quercetin against ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. *J Med Food.* 2009;12:990-995.
312. Lu J, Wu DM, Zheng YL, et al. Quercetin activates AMP-activated protein kinase by reducing PP2C expression protecting old mouse brain against high cholesterol-induced neurotoxicity. *J Pathol.* 2010;222:199-212.
313. Park HK, Kim SJ, Kwon do Y, et al. Protective effect of quercetin against paraquat-induced lung injury in rats. *Life Sci.* 2010;87:181-186.
314. MERCK S.A. Industrias Químicas. Bioflavonoides: Quercetina y Rutina. Informe a Profesionales. (2000).
315. Villar del Fresno: Farmacognosia General. Edit. Síntesis. España. (1999).
316. Choi EJ, Lee BH, Lee K, Chee KM. Long-term combined administration of quercetin and daidzeína inhibits quercetin-induced suppression of glutathione antioxidant defenses. *Food Chem Toxicol.* 2005;43:793-798.

317. Mari CW Myhrstad, Harald Carlsen, Olov Nordström, et al. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;32(5), 386-393.
318. Egert S, Boesch-Saadatmandi C, Wolfram S, et al. Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. *J Nutr* 2010;140:278-284.
319. Nagaraja Haleagrahara, Ammu Radhkrishnan, et al. Flavonoid quercetin protects against swimming stress-induced changes in oxidative biomarkers in the hypothalamus of rats. *European Journal of Pharmacology*. 2009(621), 46-52.
320. Pietta PG, et al. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000;63:1035-42.
321. Han JJ, Hao J, Kim CH, et al. Quercetin prevents cardiac hypertrophy induced by pressure overload in rats. *J Vet Med Sci*. 2009;71:737-743.
322. Hubbard GP, Wolfram S, Lovegrove JA, Gibbins JM. Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *J Thromb Haemost*. 2004;2:2138-45.
323. Carlstrom J, Symons JD, Wu TC, et al. A quercetin supplemented diet does not prevent cardiovascular complications in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*. 2007;137:628-633.
324. Adewole SO, Caxton-Martins EA, Ojewole JA. Protective effect of quercetin on the morphology of pancreatic beta-cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2006;4:64-74.
325. Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Takahashi Y. Dietary quercetin alleviates diabetic symptoms and reduces streptozotocin-induced disturbance of hepatic gene expression in mice. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53:859-868.
326. Youl E, Bardy G, Magous R, et al. Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *Br J Pharmacol*. 2010;161:799-814.
327. Anjaneyulu M, Chopra K. Quercetin attenuates thermal hyperalgesia diabetic rats. *Indian J Exp Biol*. 2004;42:766-769.
328. Anjaneyulu M, Chopra K. Quercetin, a bioflavonoid, attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27:1001-1005.
329. Kim HP, Mani I, Ziboh VA. Effects of naturally-occurring flavonoids and bioflavonoids on epidermal cyclooxygenase from guinea pigs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1998;58:17-24.
330. Lee KM, Hwang MK, Lee DE, et al. Protective effect of quercetin against arsenite-induced COX-2 expression by targeting PI3K in rat liver epithelial cells. *J Agric Food Chem*. 2010;58:5815-5820.
331. Chuang CC, Martinez K, Xie G, et al. Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. *Am J Clin Nutr*. 2010;92:1511-1521.
332. Ortega MG, Saragusti AC, Cabrera JL, Chiabrando GA. Quercetin tetraacetyl derivative inhibits LPS-induced nitric oxide synthase (iNOS) expression in J774A.1 cells. *Arch Biochem Biophys*. 2010;498:105-110.
333. Morikawa K, Nonaka M, Narahara M, et al. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci*. 2003;74:709-721.
334. Stewart LK, Soileau JL, Ribnicky D, et al. Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Metabolism*. 2008;57:S39-S46.
335. Rivera L, Morón R, Sánchez M, ET AL. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:2081-2087.
336. Mamani-Matsuda M, Kauss T, Al-Kharrat A, et al. Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. *Biochem Pharmacol*. 2006;72:1304-1310.
337. Aalinkeel R, Bindukumar B, Reynolds JL, et al. The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90. *Prostate*. 2008;68:1773-1798.
338. Borska S, Drag-Zalesinska M, Wysocka T, et al. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of quercetin on human pancreatic carcinoma cell lines EPP85-181P and EPP85-181RDB. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010;48:222-229.
339. Braganhol E, Zamin LL, Canedo AD, et al. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs*. 2006;17:663-671.
340. Choi EJ, Bae SM, Ahn WS. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Arch Pharm Res*. 2008;31:1281-1285.
341. Galluzzo P, Martini C, Bulzomi P, et al. Quercetin-induced apoptotic cascade in cancer cells: antioxidant versus estrogen receptor  $\alpha$ -dependent mechanisms. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53:699-708.



342. Choi SY, Park JH, Kim JS, et al. Effects of quercetin and beta-carotene supplementation on azoxymethane-induced colon carcinogenesis and inflammatory responses in rats fed with high-fat diet rich in omega-6 fatty acids. *Biofactors*. 2006;27:137-146.
343. Warren CA, Paulhill KJ, Davidson LA, et al. Quercetin may suppress rat aberrant crypt foci formation by suppressing inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. *J Nutr*. 2009;139:101-5.
344. Deschner E. et al.: Quercetin and rutin as inhibitors of Azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*. 1991;12: 1193-96.
345. Scambia G., et al. Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II estrogen binding sites in primary ovarian tumours and cultured cells. *British J. Cancer*. 1990. 62: 942-46.
346. Chen C, Zhou J, Ji C. Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance. *Life Sci*. 2010;87:333-338.
347. Borska S, Sopel M, et al. Quercetin as a potential modulator of P-glycoprotein expression and function in cells of human pancreatic carcinoma line resistant to daunorubicin. *Molecules*. 2010;15:857-870.
348. Oh SJ, Kim O, Lee JS, et al. Inhibition of angiogenesis by Quercetin in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 2010;48:3227-3234.
349. Scambia G, Raneletti FO, Panici PB, et al. Inhibitory effect of quercetin on primary ovarian and endometrial cancers and synergistic activity with cis-diamminedichloroplatinum(II). *Gynecol Oncol*. 1992;45:13-19.
350. Du G, Lin H, Yang Y, et al. Dietary quercetin combining intratumoral doxorubicin injection synergistically induces rejection of established breast cancer in mice. *Int Immunopharmacol*. 2010;10:819-826.
351. Jakubowicz-Gil J, Paduch R, Piersiak T, et al. The effect of quercetin on pro-apoptotic activity of cisplatin in HeLa cells. *Biochem Pharmacol*. 2005;69:1343-1350.
352. Lui Y, Kulesz-Martin M: TP53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence specific DNA binding. *Carcinogenesis*. 2001;22:852.
353. Avila MA, Velasco JA, Harter KW, et al. Quercetin as a modulator of the cellular neoplastic phenotype. *Adv Expl Med Biol*. 1996;401:101-110.
354. Yoshida M, Yamamoto M, Nikado T. Quercetin arrest human leukemic T- cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res*. 1992;52:6676-6681.
355. Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N, et al. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Lett*. 1990;260:10-13.
356. <http://mx.prvademecum.com/droga.php?droga=3482>
357. Zhang X, Li SW, Wu JF, Dong CL, Zheng CX, et al. Effects of ipriflavone on postmenopausal syndrome and osteoporosis. *Gynecol Endocrinol*. 2010;26(2): 76-80.
358. <http://mx.prvademecum.com/droga.php?droga=1209>
359. [http://www.faes.es/cursos/panda/ficha\\_tecnica/diotul.html](http://www.faes.es/cursos/panda/ficha_tecnica/diotul.html)
360. Dell'Agli M, Galli GV, Dal Cero E, Belluti F, Matera R, Zironi E, et al. Potent inhibition of human phosphodiesterase-5 by icariin derivatives. *J Nat Prod*. 2008;71:1513-1517.
361. Zhang J, Wang YB, Ma CG, Liu T, Li WR, Gong YQ, Xin ZC. Icarisid II, a PDE5 inhibitor from Epimedium wanshanense, increases cellular cGMP by enhancing NOS in diabetic ED rats corpus cavernosum tissue. *Andrologia*. 2012 May;44 Suppl 1:87-93.
362. Muller M. Mode of action of metronidazole on aerobic bacteria and protozoa. *Surgey*. 1983; 93:165-71.
363. Samuelson J Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1533-41.
364. Saurina G, De Méo L, McCormack WM. Cure of metronidazole and tinidazole resistant Trichomoniasis with use of high dose oral and intravaginal tinidazole. *Clin Infect Dis*. 1998;26(5):1238.
365. Brismar B, Edlund C, Malmborg A, Nord C. Ecological impact of antimicrobial prophylaxis on intestinal microflora in patients undergoing colorectal surgery. *Scand J Infect Dis*. 1990;70:25.
366. <http://www.revespcardiol.org/es/revistas/revista-espa%C3%B1ola-cardiologia-25/papel-los-nitratos-tratamiento-enfermedad-cardiovascular-13087920-actualizacion-futuro-oxido-nitrico-tratamiento-enfermedad-cardiovascular-2006>
367. <http://www.elsevier.es/es/revistas/anales-pediatria-37/intoxicacion-nitroprusiato-13042237-cartas-al-editor-2003>
368. Fu H, Chen H, Wang C, Xu H, et al. Flurbiprofeno, a cyclooxygenases Inhibitor, protects mice from hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibiting GSK-3 $\beta$  signaling and mitochondrial permeability transition. *Mol Med*. 2012 Jun 13. doi: 10.2119/molmed.2012.00088. [Epub ahead of print]
369. Fratelli M, Minto M, Crespi A, Erba E, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB by a nitro-derivative of fluriprofeno; a possible mechanism for antiinflammatory and antiproliferative affect. *Antioxid Redox Signal*. 2003. Apr,5(2):229-35.

- 370.S. Marioto, L. Cuzzolin, A. Adami, Del Soldato, et al. Effect of a new non-steroidal anti-inflammatory drug, nitroflurbiprofen, on the expression of inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils. *British Journal of Pharmacology*. 1995, 115, 225-226.
- 371.Wang X. Nitroflurbiprofen NicOx SA. IDrugs. 1998 Nov;1(7):807-12.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18465650>
- 372.Fiorucci S, Santucci L, Gresele P, Fiaccino RM, et al. Gastrointestinal safety of nitroaspirin (NCX 4016) in health human volunteers: a proof of concept endoscopic study. *Gastroenterology*. 2003, 124:600-6007.
- 373.Lechi C, Androli G, Gaino S, et al. The antiplatelet effect of a new nitroderivative of acetylsalicylic acid-an in vitro study of inhibition on early phase of platelet activation and on TXA<sub>2</sub> production. *Thromb Haemost*. 1996;76:791-798.
- 374.Mezzasoma AM, Momi S, Guglielmini G, Leone M, Del Soldato P, and Gresele P. Characterization of the activity of NCX 4016, a nitric oxide-releasing derivative of aspirin, on human blood platelets in vitro. *Thromb Haemost*. 1999 (Suppl):230
- 375.Momi S, Emerson M, Paul W, Leone M, Mezzasoma AM, et al. Prevention of pulmonary thromboembolism by NCX 4016, a nitric oxide releasing aspirin. *Eur J Pharmacol*. 2000;397:177-185.
- 376.Teresa Corazzi, Mario Leone, Raffaella Maucci, Lanfranco Corazzi, and Paolo Gresele. Direct and Irreversible Inhibition of Cyclooxygenase-1 by Nitroaspirin (NCX 4016). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005,315(3); 1331-37.
- 377.Del Soldato, Piero y Sannicolo', Francesco. Compuestos nitro y composiciones que los contienen que presentan una actividad antiinflamatoria, analgésica y antitrombótica. Patente Europea. Num Pub;2139199. Publicación; 01.02.2000.
- 378.Haydee Viola, Mariel Marder, Cristina Wasowski, Osvaldo Giorgi, Alejandro C. Paladini, et al. 6,3'-Dibromoflavone and 6-Nitro-3'-bromoflavone: New Additions to the 6,3'-Disubstituted Flavone Family of High-Affinity Ligands of the Brain Benzodiazepine Binding Site with Agonistic Properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000, 273;694-698.
- 379.Griebel G, Perrault G, Tan S, Schoemaker H, Sanger DJ. Pharmacological studies on synthetic flavonoids: comparison with diazepam. *Neuropharmacology*. 1999 Jul;38(7):965-77.
- 380.Mariano Cárdenas, Mariel Marder, Viviana C. Blank and Leonor P. Roguin. Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2006;14:2966-2971.
- 381.Huan-Qiu Li, Chen Xu, Hong-Sen Li, Zhu-Ping Xiao, Lei Shi, and Hai-Liang Zhu. Anti-Helicobacter pylori Agents with Potent Inhibitory Activity against HPE-Induced Interleukin-8 Production by AGS Cells. *Chem Med Chem*. 2007, 2, 1361-1369.
- 382.Schmid, H. A. Mascheka and H. Frauenschill, *Monatsh.*,80, 670-7(1949).
- 383.A. Navarro-Ocaña, E. Barcena, D. L. Gonzalez, Manuel. J. Estrada. *Oppi Briefs*,31:1.117-9(1991).
- 384.Manuel. J. Estrada, M Olivia Garcia, Arturo O. Navarro. *Steroids*.62,501-503(1997).
- 385.J.V. Crivello. *J. Org. Chem.*40,3056-60(1980)
- 386.Menke, J.B. *Recl. Trav. Chem. Pays-Bas* 1925, 44, 141.
- 387.Vandana Bansal, and RN Khanna. Regioselective mononitration of coumarins using chromium nitrate as nitrating agent. *Synthetic Communications*. 2002;32(9): 1345-50.
- 388.V.V.Polyakov. Chemical Modification of The Natural Flavonoid Myricetin. *Chemistry of Natural Compounds*. 1999.35(1); 21-28.
- 389.Jiménez-Estrada M, Muñoz González Felipe. Nitración del Flavonoide Naringenina. XLI Congreso Mexicano de Química. 24-28 de Septiembre de 2006. Trabajo desarrollado en: Instituto de Química: Lab 2-10 de Productos Naturales, UNAM.
- 390.Phromni K, Reuter S, Sung B, Limtrakul P, Aggarwal BB, A dihydroxi-pentamethoxyflavone from *Gardenia obtusifolia* suppresses proliferation and promotes apoptosis of tumor cells through modulation of multiple cell signaling pathways. *Anticancer Res*. 2010, Sep;30(9): 3599-3610.
- 391.Jérome Quintin, Didier Buisson, Sylviane Thoret, Thierry Cresteil, Guy Lewin. Semisynthesis and antiproliferative evaluation of a series of 3'-aminoflavones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2009;19: 3502-3506.
- 392.Muller KO, Borger H. *Arb. Biol. Abt.* 1941. (Aust. Reichstaust). Berl. 23, 189.
- 393.Mora, A, Paya M, Rios JL, and Alcaraz MJ. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol*.1990;40;793-797.
- 394.Brinkworth RI, Stoermer MJ, Fairlie DP. Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase. *Biochem Biophys Res Commun*.1992;188:631-7.