

Andrea Morquio, Margot Ferreira,
Florencia Arredondo, Fernanda Blasina,
Carolina Echeverry, Juan Andres Abin,
Federico Dajas.

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente
Estable.

11

Estudio comparativo de compuestos polifenólicos, actividad citoprotectora y antioxidante en especies autóctonas del género Achyrocline.

Introducción

El estrés oxidativo ha sido implicado en la patogénesis de algunos desórdenes neurodegenerativos tales como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. (Gilgun-Sherki y cols., 2001; Simonian y Coyle, 1996) La falta de agentes terapéuticos que puedan ser útiles en el tratamiento de estos desórdenes ha llevado a intensificar la búsqueda de alternativas terapéuticas frente al daño neuronal inducido por el estrés oxidativo.

Los flavonoides son una familia de difenilpropanos que se encuentran muy frecuentemente en frutas y vegetales, así como en productos y bebidas derivados de plantas tales como vino y aceite de oliva. (Schroeter y cols., 2002) Estos compuestos son considerados los ingredientes activos en algunas plantas medicinales. Ha sido demostrado que son capaces de prevenir el daño oxidativo por diversos mecanismos, entre ellos, atrapando directamente radicales libres, como quelantes de iones metálicos y como inhibidores de la actividad de numerosas enzimas, incluyendo la lipooxigenasa, ciclo-oxigenasa, xantina-oxidasa, fosfolipasa A2 y proteína quinasa. (Cushman y cols., 1991; Laughton y cols., 1991; Gil y cols., 1994; Hoult y cols., 1994; Cottelle y cols., 1996; Ratty y cols., 1998).

Debido entonces a la creciente importancia de los flavonoides como protectores de células frente a diferentes tipos de daño (Joyeux y cols., 1995; Harborne y Williams, 2000; Ishige y cols., 2001; Schroeter y cols., 2002),

incluyendo el estrés oxidativo, resulta de particular interés explorar plantas que contengan altas concentraciones de estos compuestos.

Sin embargo, estos estudios están claramente enfocados a los flavonoides como agliconas y no a los glicosidos, forma más común en la que se encuentran los flavonoides en plantas. En este momento, se asume, aunque no de forma totalmente probada, que los glicosidos no son activos per se. (Walle, 2004)

La familia Asteraceae encabeza la lista de plantas con mayor ocurrencia de flavonoides en su forma aglicona. En esta familia aparecen frecuentemente flavonas y flavonoles, a menudo sustituidos en posición 6 y/o 8. (Wollenweber y Dietz; 1980) Estas características muestran a las Asteraceas como plantas prometedoras para la protección celular.

Dentro de esta familia, elegimos especies autóctonas del género *Achyrocline*.

Una planta medicinal ampliamente utilizada en nuestro país, así como en Brasil, Paraguay y Argentina es la popularmente llamada "marcela". Varias especies son utilizadas en forma de infusión o decocción para diversos trastornos digestivos, hepáticos, como analgésico, sedante, antitumoral, antiinflamatorio, antiviral, antimicrobiano, antiespasmódico, etc.

En nuestro trabajo, comparamos la concentración de los flavonoides mayoritarios, la capacidad antioxidante y la citoprotección de infusiones de las especies: *A. satureioides*

(AS), *A. flaccida* (AF) y *Achyrocline* sp. (AB), todas ellas utilizadas bajo el nombre "marcela" en forma popular. También se realizó el estudio de la influencia de variables como lugar y tiempo de cosecha en las concentraciones de polifenoles y flavonoides mayoritarios.

Materiales y métodos

Origen del material

El material vegetal para la preparación de las infusiones utilizadas proviene de plantas cultivadas en la Estación Experimental INIA Las Brujas, en el marco de un convenio de cooperación establecido entre ambas instituciones.

Los cultivos derivan de semilla colectada en las siguientes localidades:

- *Achyrocline* sp. Davies, P. Gruta de los Helechos, Tacuarembó. 17.4.2002 - MVFA 32797
- *Achyrocline satuireioides*. Davies, P. Punta Espinillo, Montevideo. 30.4.2002 - MVFA 32798
- *Achyrocline satuireioides*. Davies, P. Gruta de los Cuervos, Tacuarembó. 17.4.2002 - MVFA 32801
- *Achyrocline flaccida*. Davies, P. Ruta 5 km 117, Florida. 16.4.2002 - MVFA 32800
- *Achyrocline flaccida*. Davies, P. Gruta de los Helechos, Tacuarembó. 17.4.2002 - MVFA 32802

Preparación de las infusiones

Se pesó 1 gramo de flor para cada planta y se dejó reposar durante 10 minutos en 50 mL de agua hirviendo; por último se filtra. El filtrado se inyecta en el HPLC luego de la dilución correspondiente, antes y después de la hidrólisis.

Medición de polifenoles totales

Se utilizó el método de Folin Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), siendo ácido cafeico (Sigma) el estándar para la curva de calibración. El reactivo de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio (20% p/p) fueron agregados a las muestras, las cuales fueron in-

cubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida luego a 765 nm.

Las concentraciones obtenidas para cada infusión fueron tomadas en cuenta para experimentos siguientes.

Medición de flavonoides por HPLC

Sustancias químicas

Se utilizó fosfato ácido de sodio y ácido fosfórico ambos provenientes de Baker Analyzed. El metanol se obtuvo de Mallinckrodt Chemical. Todas las soluciones fueron preparadas con agua destilada y desionizada. La quercetina utilizada como patrón provino de Great Dragon Enterprises Co.

Aparatos y condiciones cromatográficas

La muestra fue cargada en una válvula de inyección (Rheodyne Incorporated, loop 200 (L). La columna C18 (Biophase ;22 cm x 4,6 mm ; 5 μ m) fue protegida con una precolumna (Biophase ;3 cm x 4,6 mm ; 5 μ m). Se utilizó una bomba (LKB Bromma) manteniendo el flujo en un valor constante de 1,0 ml/min. Para la detección se contó con dos métodos que trabajaron simultáneamente. El primero fue un detector amperométrico (BAS LC-4C) con un electrodo de trabajo operando a 0,65 V y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. El otro consistió en un detector espectrofotométrico (UV-Vis Wilson 118) con una longitud de onda de 260 nm. La fase móvil utilizada constó de un 50% de metanol-50% de buffer fosfato 25 mM pH=2,4.

Hidrólisis ácida

Para el análisis de flavonoides glicosilados, se utilizó una hidrólisis ácida. (Hertog et al., 1992). La reacción fue llevada a cabo en metanol, utilizando mercaptoetanol como antioxidante y ácido clorhídrico para la hidrólisis (90°C durante 2 horas agitando a 400 rpm) Se realizaron controles con soluciones estándar de rutina y luteolina, en iguales condiciones. Con esto verificamos la eficiencia de la hidrólisis así como la integridad de las agliconas luego del tratamiento. 50 μ L de las muestras hidrolizadas y no hidrolizadas fueron inyectadas en el HPLC.

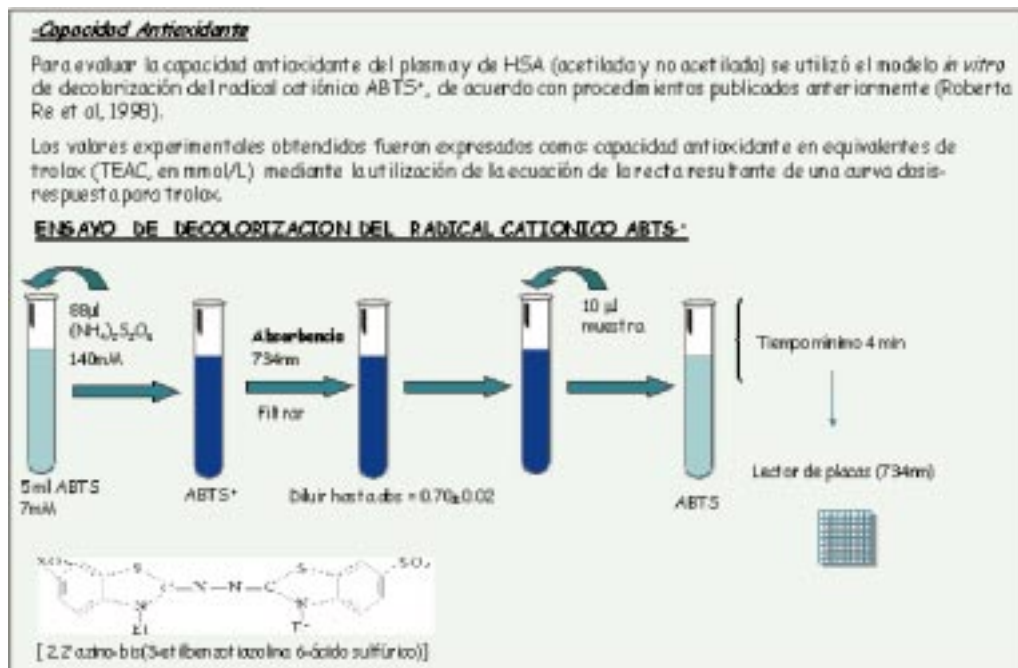
Medición de la capacidad antioxidante (ABTS)

La capacidad antioxidante de cada infusión fue evaluada estudiando su habilidad para captar el radical 2,2' azino-bis (3-etilbenzotiazolina 6-ácido sulfúrico) (ABTS.⁺) (Miller y cols., 1993)

ABTS.⁺ es producido por la reacción de una solución de ABTS (7mM) con persulfato de amonio (140mM) por 12-16 horas a tempe-

ratura ambiente y protegido de la luz. Previo a su uso, la solución stock fue filtrada y diluida en buffer fosfato salino (PBS) para obtener una absorbancia a 734 nm de 0.70 ± 0.02 . 1 mL de la solución diluida de ABTS fue mezclado con 10 μ L de muestra. El porcentaje de disminución de la absorbancia a 734 nm fue calculado para cada punto y se determinó el IC₅₀ (μ g/mLPT) para cada infusión. (Re y cols., 1999; Auddy y cols., 2003).

Figura 1. Esquema del procedimiento para la realización del ensayo de ABTS



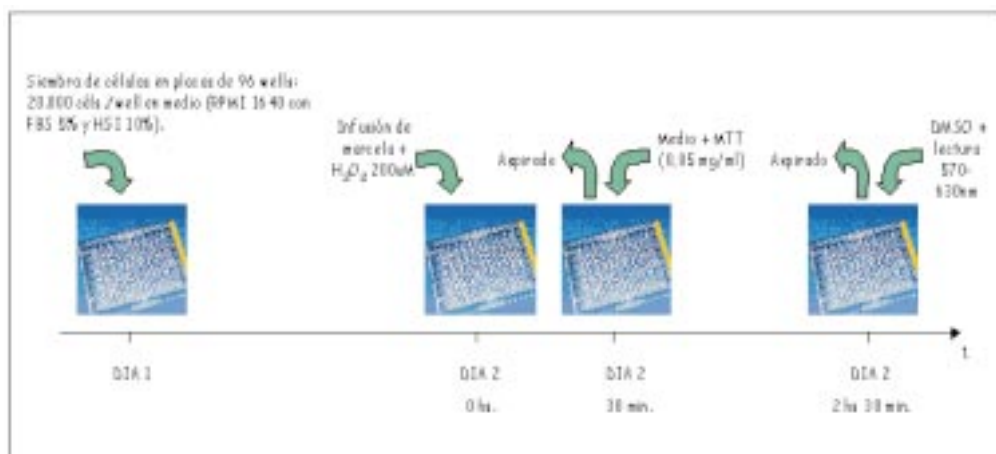
Cultivo de células PC12 no diferenciadas

La línea celular PC12 (feocromocitoma de rata) se cultivó sobre placas recubiertas con colágeno, en medio RPMI 1640 (85%) suplementado con 5% FBS y 10% HSI, penicilina 50 U/ml y estreptomycin 25 μ g/ml. Los cambios de medio se realizaron 2 veces por semana y las células se repicaron al alcanzar la confluencia, en una relación 1:5. Se incubaron en atmósfera humidificada conteniendo CO₂ 5% a 37°C.

Las células sembradas son agredidas con peróxido de hidrógeno produciéndose la muerte de un porcentaje importante de ellas. Se mide la viabilidad celular por el método colorimétrico del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Denizot y Lang, 1986) en células tratadas con peróxido de hidrógeno y en las tratadas con peróxido e infusión de marcela de forma concomitante.

Las infusiones de marcela utilizadas fueron diluidas convenientemente hasta alcanzar siempre la misma concentración de polifenoles totales.

Figura 2. Protocolo utilizado en cultivo celular. Las células (PC12) son agredidas con peróxido de hidrógeno 200 uM y de forma concomitante se realiza el agregado de la infusión de marcela. Luego de 30 minutos, se retira esta mezcla y se sustituye por medio + MTT. Se incuba durante 2 horas y 30 minutos y se realiza la lectura espectrofotométrica (570-630 nm) luego de aspirar y sustituir por DMSO para disolver los cristales de formazán.



Resultados

CONCENTRACION DE POLIFENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES MAYORITARIOS

	Muestra	PT (mg/g)	Quercetina libre (ug/g)	Quercetina total (ug/g)
Distintos tiempos de cosecha Especie: <i>A.satureiodes</i> Lugar de cosecha: Tacuarembó	Prefloración	21.7±2.7	2101.5±146.4	5480.4±27.7
	Floración	24.1±2.6	46.7±2.0	101.7±2.2
	Postfloración	13.4±0.6	58.6±2.5	271.1±2.2
Distintos lugares de cosecha Especie: <i>A.satureiodes</i> Tiempo de cosecha: floración	Pta. Espinillo	21.1±1.8	429.2±5.7	1544.0±83.2
	Tacuarembó	11.4±0.6	211.1±1.6	1026.5±39.4
Distintos lugares de cosecha Especie: <i>A.flaccida</i> Tiempo de cosecha: floración	Florida	33.9±2.3	454.0±16.7	2104.5±50.7
	Tacuarembó	28.1±2.5	999.5±1.1	2460.2±86.2
Distintas especies Tiempo de cosecha: floración Lugar de cosecha: Tacuarembó	<i>A.satureiodes</i>	11.4±0.6	211.1(1.6)	1026.5±39.4
	<i>A.flaccida</i>	28.1±2.5	999.5±1.1	2460.2±86.2
	<i>Achyrocline sp.</i>	20.8±2.3	6.4±0.3	266.2±5.7

Figura 3. En la tabla se muestran las concentraciones de polifenoles totales y flavonoides, tanto libres como glicosilados. Los datos son expresados como el promedio obtenido ± desviación estándar. Cada muestra fue procesada por duplicado. Se realizó el tratamiento estadístico por medio del test ANOVA (1 cola) seguido de comparación múltiple (Tukey) Las concentraciones de flavonoides fueron expresadas en µg/g planta utilizado para la preparación de la infusión, mientras que la de polifenoles totales se expresó en mg/g planta.

Fueron medidos también los flavonoides luteolina y 3-O-metil quercetina. Sin embargo, con el fin de simplificar el análisis, se tomó a la quercetina como flavonoide representativo. Los demás se comportaron de forma semejante.

Los resultados muestran diferencias importantes, sobre todo cuando comparamos AS en sus 3 tiempos de cosecha (prefloración, floración y postfloración) y las distintas especies entre sí.

En el primer caso, observamos que la prefloración contiene cantidades significativamente mayores de los flavonoides libres ($p < 0.0001$) y que el número de polifenoles totales solo es diferente cuando comparamos prefloración y floración vs. postfloración. Esta última es la que presenta la menor concentración ($p < 0.005$). Es interesante entonces concluir que durante la prefloración, tenemos la máxima calidad de polifenoles para la especie AS, mientras que la cantidad de estos es igual a la encontrada durante la floración.

En el caso de las especies estudiadas, vemos que tanto AF como AS presentan concentraciones importantes de quercetina, luteolina y 3-O-metil quercetina en su forma

libre. Sin embargo, la especie AB, contiene la mayoría de estos flavonoides como glicósidos. La concentración de quercetina libre en AB es significativamente menor a la encontrada en las especies restantes ($p < 0.0001$). Mientras AS y AF presentan una relación Q_{total}/Q_{libre} de 4.9 y 1.6 respectivamente, la relación para AB fue 42. Si observamos los valores de concentración de polifenoles totales para cada especie, no encontramos diferencias significativas, excepto cuando comparamos AS vs. AF ($p < 0.05$) La especie AF contiene el mayor número de polifenoles totales en la infusión. Resulta interesante entonces observar que entre AS o AF y AB no exista diferencia en el número total de polifenoles, habiendo una gran diferencia en la calidad de estos.

En los grupos que difieren en el lugar de cosecha, existieron diferencias. En cuanto a polifenoles totales las 2 muestras de AS resultaron diferentes, siendo Pta. Espinillo mayor a Tacuarembó ($p < 0.05$); sin embargo esta diferencia no se manifestó en las concentraciones de quercetina. Para las muestras de AF resultó lo contrario, observándose mayor concentración de quercetina en la muestra de Tacuarembó. ($p < 0.0005$).

CITOPROTECCION

Figura 4. Efecto de la infusión de *Achyrocline satureioides* sobre la viabilidad celular (ensayo de MTT). En la zona A, se representa la citotoxicidad de la infusión para distintas concentraciones de polifenoles totales. En la zona B, aparece el daño con peróxido de hidrógeno concomitante al agregado de la infusión en sus distintas concentraciones (citoprotección).

C: Control; CV: Control vehículo; P: Peróxido; PV: Peróxido vehículo; AS N°: *Achyrocline satureioides*. El número representa la concentración de polifenoles totales. Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar.

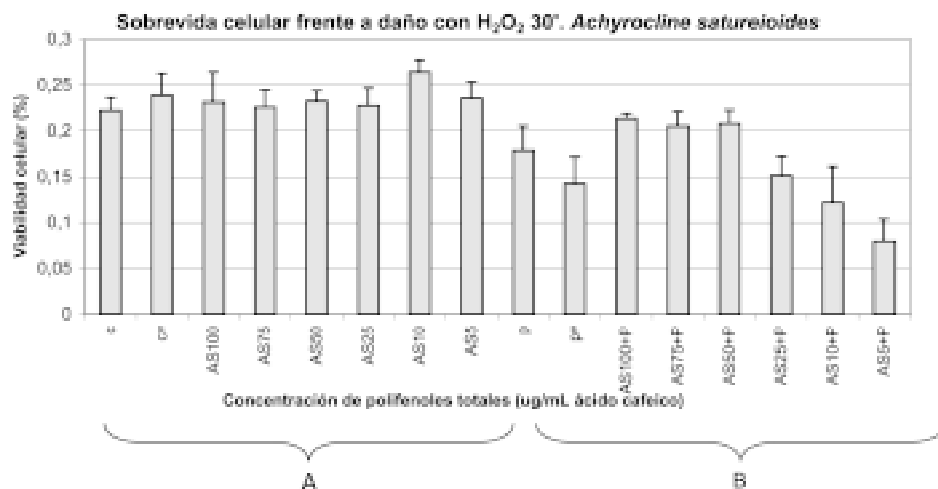


Figura 5. Efecto de la infusión de *Achyrocline* sp. sobre la viabilidad celular (ensayo de MTT). En la zona A, se representa la citotoxicidad de la infusión para distintas concentraciones de polifenoles totales. En la zona B, aparece el daño con peróxido de hidrógeno concomitante al agregado de la infusión en sus distintas concentraciones (citoprotección)

C: Control; CV: Control vehículo ; P: Peróxido; PV: Peróxido vehículo; MB N°: *Achyrocline* sp. El número representa la concentración de polifenoles totales. Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar.

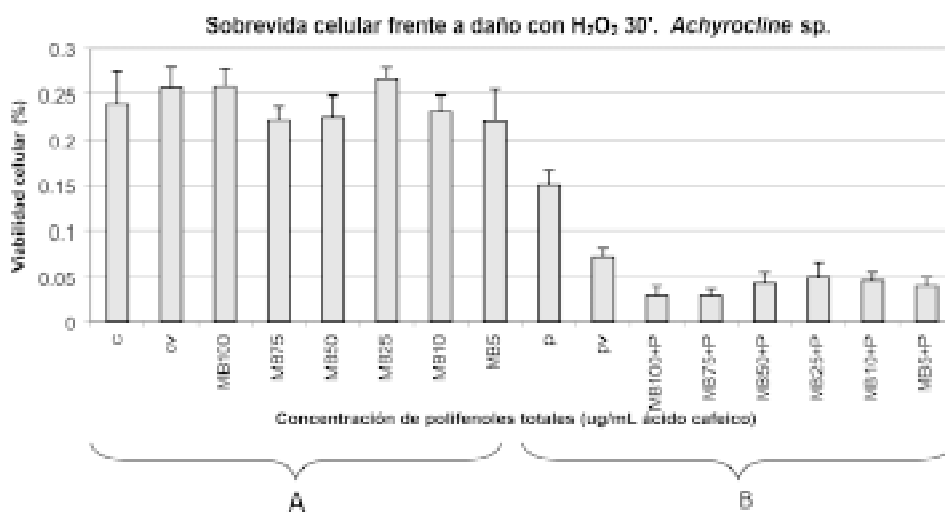
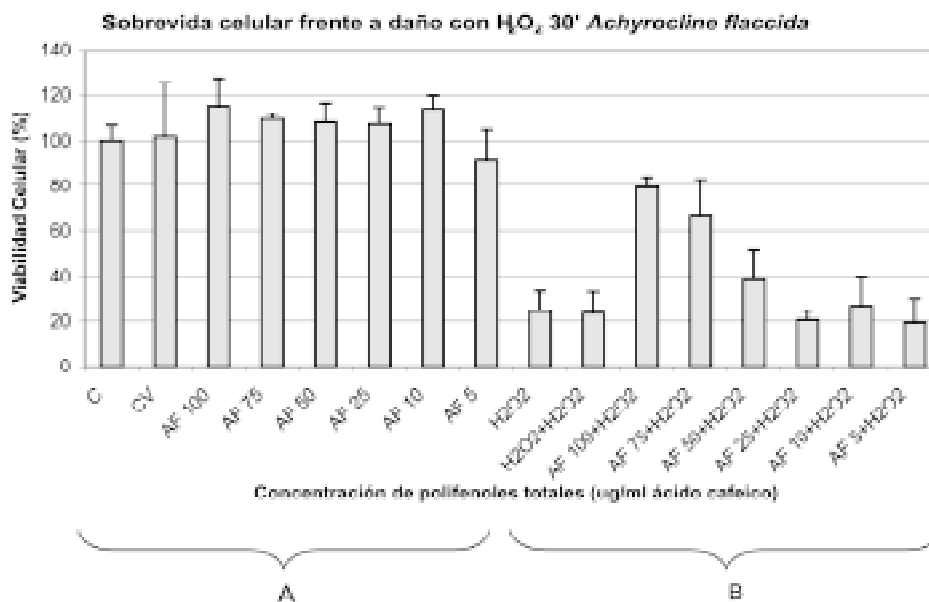


Figura 6. Efecto de la infusión de *Achyrocline flaccida* sobre la viabilidad celular (ensayo de MTT). En la zona A, se representa la citotoxicidad de la infusión para distintas concentraciones de polifenoles totales. En la zona B, aparece el daño con peróxido de hidrógeno concomitante al agregado de la infusión en sus distintas concentraciones (citoprotección)

C: Control; CV: Control vehículo ; P: Peróxido; PV: Peróxido vehículo; AF N°: *Achyrocline flaccida*. El número representa la concentración de polifenoles totales. Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar.



Elegimos analizar la capacidad citoprotectora de las especies cosechadas en Tacuarembó. Esto fue debido a que las diferencias más importantes en cuanto a concentración de flavonoides libres vs. glicosilados se encontraron en este grupo.

En primer lugar se observa que ninguna de las 3 especies resultó tóxica para las células PC 12 no agredidas, a ninguna de las concentraciones probadas.

Cuando analizamos la citoprotección vemos que tanto para AS como para AF, la viabilidad celular de PV (peróxido-vehículo) es significativamente menor a la encontrada cuando se encuentran presentes en el me-

dio estas infusiones en el rango de concentración de 100 a 50 $\mu\text{g/mL}$ ácido cafeico. Vemos entonces que el efecto citoprotector es dosis dependiente. De forma contraria, en el caso de AB, no se observó citoprotección para ninguna de las concentraciones, encontrándose inclusive una disminución de la viabilidad celular respecto a PV en presencia de la infusión. Las 3 infusiones fueron probadas para iguales concentraciones de polifenoles totales; la diferencia existió en las cantidades de flavonoides libres. Como se describió en el punto anterior, AB presenta sus flavonoides como glicósidos en un alto porcentaje, lo que explicaría su menor actividad.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

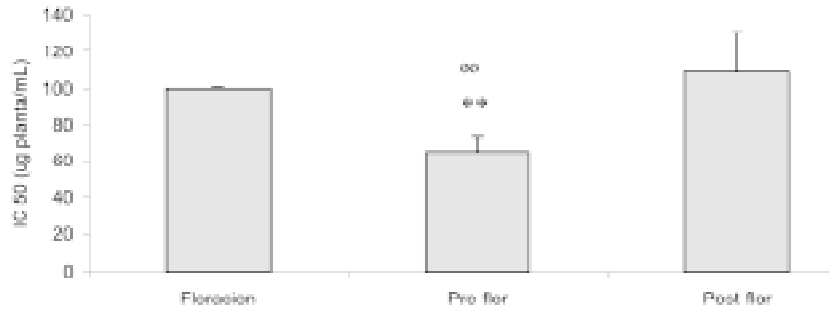


Figura 7. En la gráfica se muestra la capacidad antioxidante (CA) de *Achyrocline satureioides*, evaluada por el ensayo de ABTS. Los datos fueron expresados como IC 50 ($\mu\text{g planta/mL}$). Las muestras fueron evaluadas en 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó un test ANOVA (por una cola) (Comparación múltiple Tukey)

** $p < 0.005$

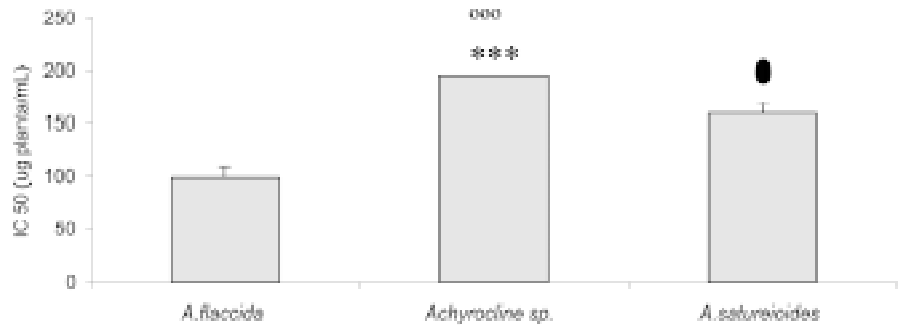


Figura 8. En la gráfica se muestra la capacidad antioxidante (CA) de las distintas especies de marcela, evaluada por el ensayo de ABTS. Los datos fueron expresados como IC 50 ($\mu\text{g planta/mL}$). Las muestras fueron evaluadas en 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó un test ANOVA (por una cola) (Comparación múltiple Tukey)

*** $p < 0.0001$

● $p < 0.0005$

La capacidad antioxidante se encuentra directamente relacionada con la cantidad de quercetina libre. Los valores fueron expresados para igual concentración de polifenoles totales. Vemos entonces aquí también reflejado que lo más importante es la calidad y no la cantidad de estos compuestos. Cuando comparamos distintos tiempos de cosecha,

se observa que obtenemos una mayor capacidad antioxidante cuando la planta se encuentra en prefloración. Las especies probadas siguieron el siguiente orden AB>AS>AF en sus valores de IC 50, lo que evidencia que AF fue la especie con mayor capacidad antioxidante.

<i>Achyrocline flaccida</i>	Florida	Tacuarembó
	110.3 ± 17.1	98.2 ± 10.5
<i>Achyrocline satureioides</i>	Pta. Espinillo	Tacuarembó
	97.8 ± 20.2	158.9 ± 8.9

Figura 9. En la tabla se muestra la capacidad antioxidante de las 2 especies (*A. flaccida* y *A. satureioides*) cosechadas en distintos departamentos del Uruguay. Los datos fueron expresados como IC 50 (μg planta/mL). Las muestras fueron evaluadas en 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó un test ANOVA (por una cola) (Comparación múltiple Tukey)

Discusión

Uno de los aspectos importantes a destacar, es la relevancia de las distintas variables en las características tanto analíticas como biológicas de la planta. Pudimos observar que dependiendo tanto del tiempo de cosecha, como de la especie y también, aunque en menor grado del lugar de cosecha, las concentraciones de los compuestos activos varían enormemente, lo que se ve reflejado en las actividades testadas.

Necesariamente para concluir acerca de los distintos lugares de cosecha y las variaciones que esto provoca en la planta, hubiera sido conveniente realizar un muestreo más amplio, incluyendo varias zonas de nuestro país.

En este estudio evaluamos la actividad antioxidante de las distintas infusiones de "marcela", por medio de la habilidad para captar al radical ABTS*. Se encontró, para todas ellas una importante capacidad "scavenger". Actividades similares han sido descritas previamente para extractos de AS (Desmarchelier y cols., 1998; Gugliucci y Menini, 2002), sin embargo hasta donde conocemos, no se han reportado estudios comparativos, evaluando las distintas variables aquí consideradas.

El resultado de mayor relevancia para nuestros intereses se encontró en el grupo de las especies AF, AS y AB. En estas se encontró una correlación positiva entre la capacidad antioxidante y citoprotectora y la concentración de quercetina libre. Esta característica no es general para todas las plantas. En un trabajo previo, demostramos que la capacidad antioxidante de *Epilobium parviflorum* (EP) no se correlaciona con su contenido de flavonoides libres y que, a pesar de tener un valor de IC 50 2 veces menor al encontrado para AS, no es capaz de proteger en cultivo celular. Al analizar los flavonoides de EP cromatográficamente, vimos que tanto la quercetina como miricetina y kaempferol presentes en la infusión, se encuentran totalmente glicosilados (Arredondo y cols.; 2004) al contrario de lo que sucede en AS, donde una cantidad importante de los flavonoides se presenta como aglicona.

Al colocar la infusión en contacto con las células, la quercetina, presentándose como aglicona tendría mayor probabilidad de penetrar en las células. Los glicósidos son moléculas de mayor polaridad, por lo tanto tendrán en principio, más dificultad para atravesar las barreras fosfolípídicas de las membranas celulares. Los mecanismos de citoprotección por flavonoides, no han sido totalmente establecidos. La capacidad

“scavenger” de las infusiones parecería ser un factor necesario aunque no determinante para proteger. Otras actividades biológicas han sido reportadas para flavonoides, incluyendo efectos en diversos componentes de la señalización intracelular y de la expresión génica. Aparentemente, la habilidad de los flavonoides para prevenir la muerte celular luego de un daño oxidativo, dependería de la modulación de cascadas de señalización intracelular y sus efectos en la función mitocondrial (Casadeus y cols., 2002; Schroeter y cols., 2002). En este sentido, la “marcela” presenta una interesante combinación de flavonoides con potente actividad citoprotectora, siendo entonces prometedora en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas en patologías asociadas al daño celular inducido por estrés oxidativo.

Para el estudio de la citoprotección in vivo, la biodisponibilidad de agliconas y glicósidos debe ser considerada, ya que resulta un fac-

tor determinante para la efectividad. Los glicósidos son clivados enzimáticamente en el intestino luego de la ingestión oral, liberándose las agliconas (Walle, 2004). Sin embargo, en un estudio realizado en humanos, Erlund y cols. compararon la biodisponibilidad de quercetina y rurtina. Observaron que luego de la ingestión de quercetina aglicona se obtuvieron concentraciones plasmáticas más elevadas en menor tiempo, así como una menor variación interindividual (Erlund y cols., 2000).

La “marcela” es una planta popularmente muy utilizada; sin embargo las distintas especies son usadas de forma indistinta, atribuyéndoles a todas ellas las mismas propiedades. En este trabajo hemos visto que no todas presentan la misma composición y que su actividad biológica es claramente diferente. Sería entonces interesante continuar trabajando en este sentido aportándole rigor científico al saber popular.

Bibliografía

- Arredondo F., Blasina F., Echeverry C., Morquio A., Ferreira M., Abin-Carriquiri J.A., Lafon L., Dajas F. 2004. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology* 91 (1), 13-20.
- Auddy, B., Ferreira, M., Blasina, F., Lafon, L., Arredondo, F., Dajas, F., Tripathy, P., Seal, T., Mukherjee, B., 2003. Screening of antioxidant activity of the Indian medicinal plants traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 84, 131-138.
- Casadeus G., Shukitt-Hale B., Joseph J.A. 2002. Qualitative vs. quantitative caloric intake: are they equivalent paths to successful aging? *Neurobiology of Aging* 23, 747-769.
- Cotelle, N., Bernier, J. L., Catteau, J. P., Pommery, J., Wallet, J. C., Gaydou, E. M., 1996. Antioxidant properties of hydroxyflavones. *Free Radical Biology (Medicine)* 20, 35-43.
- Cushman, M., Nagaratham, D., Burg, D. L., Geahlen, R. L. 1991. Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoid analogues. *Journal of Medical Chemistry* 34, 798-806.
- Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* 89, 271-277.
- Desmarchelier C., Coussio J., Ciccio G. 1998. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. (“marcela”). *Brazilian Journal of Medicine & Biological Research* 31, 1163-1170.
- Erlund I., Kosonen T., Alftan G., Maenpaa J., Perttunen K., Kenraali J., Parantainen J., Aro A. 2000. Pharmacokinetics of quercetina from quercetina aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology* 56 (8), 545-553.
- Gil, B., Sanz, M. J., Terencio, M. C., Ferrandiz, M. L., Bustos, G., Payà, M., 1994. Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipase A2 and inflammatory responses in mice. *Life Sciences* 54, 333-338.
- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D., 2001. Oxidative stress-induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40:8, 959-975.

- Gugliucci A., Menini T. 2002. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides*. Life Sciences 71, 693-705.
- Harborne, J. B., Williams, C. A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 55, 481-504.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Venema, D. P., 1992. Optimization of quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in fruit and vegetables. Journal of Agricultural & Food Chemistry 40, 1591.
- Hoult, J. R. S., Moroney, M. A., Payá, M., 1994. Action of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclo-oxygenase. Methods in Enzymology 234, 443-455.
- Ishige, K., Schubert, D., Sagara, Y., 2001. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. Free Radical Biology (Medicine 30, 433-446.
- Joyeux, M., Lobstein, A., Anton, R., Mortier, F., 1995. Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. Planta Medica 61, 126-129.
- Laughton, M. J., Evans, P. J., Moroney, M. A., Hoult, J. R. C., Halliwell, B., 1991. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to ion-reducing ability. Biochemical Pharmacology 42, 1673-1681.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical Sciences 84, 407-412.
- Ratty, A. K., Sunamoto, J., Das, N. P., 1988. Interaction of flavonoids with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazinyl free radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1. Biochemical Pharmacology 37, 989-995.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 26, 1231-1237.
- Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J. P.E., Williams, R. J., Cadenas, E., Rice-Evans, C., 2002. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. Neurobiology of Aging 23:5, 861-880.
- Simonian, N.A., Coyle, J.T., 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 3, 83-106.
- Singleton, V., Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of total polyphenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16, 144-158.
- Walle T., 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. Free Radical Biology (Medicine 36 (7), 829-837.
- Wollenweber E., Dietz V., 1980. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. Phytochemistry 20 (5), 869-932.