

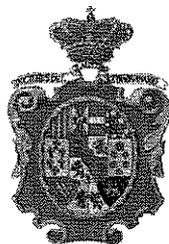
REAL ACADEMIA DE DOCTORES DE ESPAÑA

**APORTACIÓN AL ESTUDIO
DE LOS FLAVONOIDES**

DISCURSO DEL
Sr. Doctor D. Francisco Tomás Lorente

EN LA TOMA DE POSESIÓN COMO
ACADÉMICO NUMERARIO
DE LA SECCIÓN DE FARMACIA
EL DÍA 24 DE MARZO DE 2004

Y CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO
Sr. Doctor D. Luis Cepeda Muñoz



MADRID XXI

Imprime: Tipografía San Francisco, S.A.

A mi esposa Anamaría

A mis hijos: Francisco Abraham,

Mabel,

Manuel David,

Santiago Daniel,

Ulrika,

y Luis Benjamín.

A mis nietos: Ana,

Kiko,

Luis,

Isabel,

Daniela,

y Lucia

ÍNDICE

Agradecimientos	7
Aportación al estudio de los flavonoides	11
Introducción	13
Generalidades	17
Química	19
Evolución de los métodos de los análisis de los flavonoides	21
Bioactividad y Farmacología	39
Conclusión	51
Contestación del Académico Numerario	
Sr. Dr. D. Luis Cepeda Muñoz	53
Bibliografía	61
Fórmulas	69

Excmo. Sr. Presidente,

Excmos. e Ilustrísimos Sras y Sres Académicos,

Señoras y Señores,

Acudimos con gran emoción y sentido de responsabilidad para ingresar en esta docta Academia, reconociendo nuestra simpatía a todos los que nos han favorecido con su aquiescencia.

Durante el amplio periodo de tiempo que dedicamos a la investigación, contactamos con numerosos e importantes investigadores entre los que mencionamos:

En primer lugar con nuestro más profundo agradecimiento al Profesor Ángel Santos Ruiz, pleno de méritos científicos, académicos y morales, quien siempre creyó en nuestras cualidades investigadoras y docentes.

Igualmente tenemos que agradecer al Profesor Arne Wilhelm Kariu Tiselius (Premio Nóbel de 1948), de la Universidad de Upsala, por el fuerte estímulo que representó para nosotros sus consejos.

También recordamos al Profesor Micheel, de la Universidad de Münster quien fue nuestro director científico en Alemania.

Al Profesor José-María Albareda, quien nos estimuló en la investigación.

Al Profesor José Botella Llusía, por su apoyo científico.

Al Profesor Manuel Lora Tamayo, con el que coincidimos en distintos proyectos de investigación del C.S.I.C., quien nos aconsejó en nuestra trayectoria científica.

Al Profesor Antonio González González, con el que también estuvimos coordinados en proyectos del C.S.I.C..

Debemos reconocer las atenciones recibidas de otros muchos investigadores, con los que tuvimos frecuentes contactos de trabajo y participamos en

distintas publicaciones científicas y en Congresos y que entre otros podemos recordar:

Al Profesor Jeffrey Harborne, de la Universidad de Reading, Inglaterra.

Al Profesor Ken Markham, de la Universidad de Petone, Nueva Zelanda.

Al Profesor Eckhard Wollenweber, de la Universidad de Darmstad, Alemania.

Al Profesor Philippe Lebreton, de la Universidad de Lyon, Francia.

Al Profesor Jean Chopin, de la Universidad de Lyon, Francia.

Al Profesor Bernard Voirin, de la Universidad de Lyon, Francia.

Al Profesor Maurice Jay, de la Universidad de Lyon, Francia.

Al Profesor Wolfran Trowitz, de la Universidad de Berlín.

Al Profesor Angel Villar, Catedrático de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Al Profesor de Investigación Francisco A. Tomás Barberán, Director del Laboratorio de Fitoquímica del CEBAS de Murcia, continuador de la línea de investigación que iniciamos, apoyado por el Profesor Dr. Ferreres de Arce y las Investigadoras Dra. Gil Muñoz y Dra. García-Viguera.

Recordamos al Profesor Rafael Cadórniga Carro, Catedrático de Farmacia Galénica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, que nos precedió en 1994 con el sillón 26 de Numerario de esta digna Academia y ausente desde 1999.

Agradecemos muy sinceramente a nuestros tres presentadores en la Real Academia de Doctores de España, para Académico Numerario 26, de la Sección de Farmacia, y que son:

El Dr. Carlos Barros Santos, Dr. en Veterinaria y Académico Numerario de dicha Sección.

- Director del Centro de Alimentación y Nutrición de Majadahonda.
- Director y fundador de la Revista Alimentaria.

La Dra. María Cascales Angosto, Académica Numeraria de la Sección de Farmacia.

- Presidenta de la Sección de Farmacia de esta Academia.
- Medalla de Oro al mérito doctoral, de esta Academia.

El Dr. Luis Cepeda Muñoz, Académico Numerario de la Sección de Farmacia, hasta hace poco vicepresidente de la Real Academia de Doctores de España.

- Ha sido, Jefe de la Inspección Técnica de Farmacia, de Registros y Medicamentos y de la Unidad de Medicamentos Especiales y Miembro del Comité de Medicamentos de la Unión Europea.
- Subdirector del Centro Nacional de Farmacobiología.

Como buen amigo que es, ha tenido la amabilidad de hacerme la Contestación, por lo que le estoy muy agradecido.

Finalmente mencionaremos: A mis predecesores, mi abuelo materno, farmacéutico y químico y al paterno, notario.

Y a mis padres y esposa que siempre me animaron.

APORTACIÓN AL ESTUDIO
DE LOS FLAVONOIDES

INTRODUCCIÓN

En investigación no podremos avanzar si desconocemos lo que realizaron quienes nos precedieron.

Como ejemplo, citaremos los trabajos científicos de Albert Einstein, que fueron analizados por el Profesor Jürgen Renn y opinaba que cada uno de ellos era la consecuencia final de una larga cadena de investigaciones hechas por los maestros de la física clásica, Boltzmann, Planck y Lorentz, cuyos resultados eran interpretados por Einstein desde una perspectiva nueva con implicaciones revolucionarias.

Einstein en su teoría sobre la composición de la luz, por la que recibió el Premio Nobel en 1922, se basó en los trabajos de Planck, sobre la frecuencia de la luz en relación con la energía y en la teoría que Newton emitió, quien sustentaba que la luz era un rayo de partículas, estableciendo su célebre paradoja de que la luz tiene propiedades tanto de ondas como de partículas, disponiendo de una frecuencia como ondas y además de unos cuantos energéticos, que más tarde se llamarían fotones.

Los trabajos de Einstein sobre física hay que interpretarlos como básicos y de ciencia pura, pero pueden servir de ejemplos aplicables a otros campos de la ciencia, en cuanto a su metódica de información inicial sobre las investigaciones de otros científicos, en cuyos trabajos se basaba para obtener sus conclusiones originales.

En Bioquímica, en Biología y en Medicina, podremos encontrar numerosos ejemplos donde determinadas publicaciones sirvieron de base para hacer investigaciones relevantes.

La observación de dos enfermedades carenciales vitamínicas, el beri-beri y el escorbuto, pudieron inspirar a unos biólogos a estudiar sustancias o vitaminas que pudiera curar una púrpura de etiología desconocida.

El beri beri (del cingalés “beri”, debilidad), se manifiesta como una polineuritis periférica grave y en cuya sintomatología es frecuente la parálisis, la hidropenia y la insuficiencia cardíaca. Se trata de una enfermedad producida por la deficiencia de la vitamina antineurítica B₁, relacionada con la ingesta de arroz molido y descascarillado y por tanto sin vitamina B₁, que ha provocado numerosas muertes.

El escorbuto (denominación derivada del antiguo neerlandés, que significa tiña), es una enfermedad de curso lento, debida a la falta o insuficiencia de vitamina C. Muestra tumefacción en las encías, depresión nerviosa, tinte amarillo de la piel y equimosis subepidérmicas que suelen ulcerarse, anemias, hemorragias múltiples, dolores articulares, cuyas peculiaridades han sido descritas en numerosas narraciones pretéritas de viajes en barco. Esta afección ataca también a los niños de pecho alimentados sólo con leche esterilizada que muestran anemia.

Una tercera enfermedad o anomalía, la púrpura hemorrágica inespecífica, no relacionada con enfermedades ni con estados seniles, estuvo muy difundida en la Europa Central y Nórdica y se mostraba con púrpuras en la cara y en el cuerpo, con fuertes dolores, sobre todo a bajas temperaturas y con el ejercicio físico intenso, debido a las extravasaciones sanguíneas subcutáneas.

La púrpura es una afección caracterizada por la formación de manchas rojas en la piel, por la rotura de los capilares sanguíneos y pueden ser la expresión de diferentes enfermedades. De algunas haremos una breve descripción: Púrpura de Schönlein-Henoch, de sintomatología abdominal; Púrpura hemorrágica, por depósito de hemosiderina; Púrpuras relacionadas con infecciones como neoplasias, amiloidosis, etc.; Púrpura crioglobulinémica, que se presenta en diferentes procesos, como kala-azar, mieloma, lupus, leucemias, etc.; Púrpura trombopénica relacionada con una marcada trombopenia; Púrpura fulminans, ocasionada por embolismo séptico; Púrpura gangrenosa, seguida de gangrena cutánea; Púrpura escorbútica, antes descrita; Púrpura trombótica o trombocitopénica, de carácter muy grave con hemorragias diversas., etc, etc.

Un equipo de investigadores húngaros decidió estudiar la púrpura hemorrágica inespecífica, con la presunción de estar ante una enfermedad carencial del tipo del beri beri y del escorbuto. Szent-Giörgyi y colaboradores publica-

ron en la prestigiosa revista Nature, tres trabajos en 1936 y otro en 1937, todos relacionados con la que llaman vitamina P, contenida en la Citrina procedente del limón y compuesta por hesperidina, predominantemente, acompañada con algo de eriodictiol y vitamina C. Utilizaban cobayas rasuradas a las que se les provocaba la púrpura hemorrágica con alimentos apropiados. Al administrarles Citrina por vía intravenosa, desaparecían los síntomas de la enfermedad en una sola noche. Para conocer la composición de la Citrina tuvieron que recurrir a la cristalización. También comunicaron que para obtener efectividad curativa era necesario emplear la hesperidina con pequeñas cantidades de vitamina C, pero que la hesperidina o el ácido ascórbico, empleados aisladamente, no curaban la enfermedad. La denominación de la Citrina como vitamina P puede corroborar la tesis de que los investigadores húngaros creyeron encontrarse ante una enfermedad carencial vitamínica.

Los trabajos expuestos, pese a ser comunicaciones condensadas de una página como máximo, produjeron un gran impacto científico, pues daban a conocer como primicia la acción farmacológica de un flavonoide, por lo que conjuntamente con un estudio sobre los procesos metabólicos de la vitamina C y sobre la catálisis del ácido fumárico, se le concedió a Szent-Giörgyi el Premio Nóbel en 1937. Su fina intuición científica le hizo investigar sobre los flavonoides y la vitamina C, y posteriormente se demostró, que existe una relación entre ambas sustancias, el flavonoide se comporta como agente economizador del ácido ascórbico, por acelerar la reacción que transforma el ácido dehidroascórbico en ácido ascórbico.

El ácido ascórbico interviene a su vez en la síntesis del colágeno, por la necesidad de producir lisina y prolina para obtener la síntesis del colágeno.

También se conoce que los flavonoides influyen en la reticulación de las fibras del colágeno y favorecen su estabilidad, como sucede con la hidroqueretina, rutina, naringenina y las catequinas.

Los flavonoides y la vitamina C, muestran una relación interactiva de gran interés, lo que intuyó Szent-Györgyi en sus trabajos sobre ambos compuestos.

Szent-Györgyi, publica en 1955, un interesante trabajo científico sobre las perspectivas de los flavonoides, de los que opina les espera un futuro muy esperanzador.

Nosotros consideramos a Szent-Giörgyi como el auténtico promotor de la investigación de los flavonoides.

En su época fue considerado como el mejor biólogo de siglo XX, y el creador de la biología celular quien consideraba a las células como un plasma electrónico activado.

En 1957 lanzó un mensaje hacia el futuro de gran importancia y opina que los quelatos que los flavonoides forman con los metales aportan unas importantes funciones biológicas y es posible que ello constituya la clave para entender sus comportamientos en el mecanismo de la vida.

En el momento actual, todas las expectativas optimistas sobre los flavonoides se han superado y nos ofrecen una rica realidad de avances en sus conocimientos, en sus bioactividades y en sus farmacologías, pero creemos que aun nos esperan sorpresas agradables en la investigación biológica de los flavonoides.

GENERALIDADES

De todo el carbono sintetizado por las plantas corresponde a los flavonoides un 2%, aproximadamente, según Smith en 1972.

Según Harborne, se han identificado más de 4.000 flavonoides diferentes en plantas vasculares. Seguramente su número debe de ser mucho mayor, ya que es relativamente pequeño el número de especies analizadas. Por otra parte debemos considerar la gran cantidad de variantes que pueden obtenerse de una estructura básica, según sean los sustituyentes : hidroxilos, metoxilos, metilos, isoprenilos, etc.,. También pueden presentar distintos grados de polimerización (monomérico, dimérico, oligomérico) y de conjugación (glicosidación, malonilación, sulfatación).

Las estructuras básicas de los flavonoides están condicionadas por la clase de los sustituyentes que tienen: la tangeretina, sinensetina y derivados muy metoxilados son liposolubles y los glicósidos en general son hidrosolubles. Los pesos moleculares son muy variables, la flavona tiene un peso molecular de 222, y por contraste en las primulaceas hay un pigmento antocianico azul con peso molecular de 1759.

El número de flavonoides que contienen las distintas especies es muy variable, pudiendo superar en más de cincuenta el número de estructuras diferentes en una sola planta. El significado biológico para cada especie está todavía por aclarar.

Un aspecto de gran consideración en el campo botánico es la constancia en la dotación de flavonoides para cada especie.

La distribución es muy amplia en las distintas especies vegetales, localizándose preferentemente en órganos aéreos, como hojas, tallos y flores, normalmente como heterósidos, lo que puede facilitar su estudio y sus hibridaciones.

La cantidad de trabajos de investigación sobre flavonoides es tan grande que es difícilísimo establecer su número, pero supera varias decenas de miles. El interés de su conocimiento está basado en las propiedades que muestran: carácter antioxidante, anticancerígeno, vasoprotector, antiinflamatorio, antibacteriano, antifúngicos, inhibidores de procesos enzimáticos, modificadores de los niveles del colesterol y de los lípidos, antiagregantes plaquetarios, actividad estrogénica y otras muchas propiedades bioactivas y farmacológicas.

Por lo anteriormente expuesto, los flavonoides son de gran interés para los químicos, biólogos, botánicos, farmacólogos, alergólogos, oncólogos y otros muchos especialistas.

QUIMICA

En las plantas las estructuras de las agliconas de los flavonoides pueden ser muy variadas, pero su núcleo básico está formado por quince carbonos configurados por C₆-C₃-C₆, que implica a dos anillos fenólicos unidos entre sí por una configuración C₃ acompañado generalmente por un -O- para constituir el anillo C, o anillo central. Al fenol de la izquierda se le denomina anillo A y al que expresamos a la derecha se le llama anillo B.

Los flavonoides se consideran estructuralmente derivados de la 2-fenil-benzopirona, que se denomina FLAVONA.

En la naturaleza existen algunas agliconas, pero normalmente los derivados glicósidos son los que predominan.

Las variaciones estructurales sobre el núcleo básico se forman en la naturaleza por : hidroxilación, metilación de grupos hidroxilos en orto, dimerización, glicosidación de hidroxilos libres para la formación de O-glicósidos, o del C del núcleo para formar C-glicósidos, preferentemente en las posiciones 6 y 8, sulfatación, acilación, implicación de los C del núcleo con grupos isoprenoides, etc.. A efectos de clasificación son importantes el doble enlace entre C-2 y C-3, o la saturación del mismo, y la presencia de un hidroxilo en C-3. Fundamentalmente se consideran los siguientes grupos: flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles, isoflavonas, chalconas y auronas.

Las sustancias relacionadas con los flavonoides son: catequinas, leucoantocianos, antocianos, y neoflavonas.

Las características diferenciales de los flavonoides son: Las flavonas disponen de doble enlace entre 2-3. Los flavonoles además tienen un hidroxilo en posición 3. Las flavanonas derivan de las flavonas por supresión del doble enlace entre 2-3. Las chalconas muestran el anillo C abierto. Las isoflavonas que tienen el anillo B unido al C-3 en vez del C-2, como es la daidzeína y la genisteína.

Los C- heterósidos en C-6 y en C-8 se muestran con poca frecuencia en la naturaleza.

Otras estructuras poco frecuentes pero muy interesantes son los derivados isoprenilados , generalmente en el C-6 y en C-8.

La metilación nuclear produce derivados C-metilados , como la 6-C-metil apigenina (Rabesa y Voirun, 1979).

La condensación de dos núcleos de flavonoides conduce a los biflavonoides, como la amentofenona.

En 1974, Lee et al., demostraron por técnicas de difracción de rayos X, haber encontrado una flavanona con un bromo en posición C-8 , en una planta empleada en medicina china.

Por metilación de agrupaciones orto-dihidroxílicas se forman derivados metilen-dioxi (Bouillant et al. 1978).

La ciclación de derivados isoprenilados con hidroxilo en orto conduce a estructuras tetracíclicas (Camela et al., 1980).

Los ácidos orgánicos pueden acilarse a los hidroxilos de un flavonoide, por biosíntesis, obteniéndose los flavonoides acilados como el encontrado por Wollerbewer et al., en 1978.

Más frecuente es encontrar derivados acilados en heterósidos, especialmente del ácido cinámico, benzoico, acético y otros ácidos alifáticos.

Se han identificado unos flavonoides con estructuras muy complejas como el derivado del trifenilmetano , encontrado por Selligman y Wagner, (1981) y el moracenin-B, con carácter hipotensivo, encontrado por Oshima et al., (1981).

EVOLUCIÓN DE LOS METODOS DE ANÁLISIS DE FLAVONOIDES

El punto de partida que incita a los investigadores a trabajar sobre los flavonoides lo situamos en el año 1936, con el trabajo publicado en Nature por Rusznyák y Szent-Giörgyi, sobre la actividad farmacológica de un flavonoide del limón al que denominan vitamina P.

Inicialmente los métodos de aislamiento e identificación de los flavonoides y de las sustancias orgánicas naturales en general, consistían en extracciones acuosas, en frío o en caliente, a diferentes pH, con distintos alcoholes y disolventes orgánicos, con variados sistemas de concentración y empleando la cristalización como mejor sistema de purificación antes de identificarlos por medio del análisis elemental orgánico y diferentes reacciones de color y otros sistemas que necesitaban de un gran esfuerzo y tiempo.

Se puede considerar al año 1948 como el del comienzo revolucionario de los métodos de análisis para la separación e identificación de toda clase de sustancias naturales y de procedencia animal, como consecuencia de las investigaciones sobre electroforesis y adsorción, en principio especialmente aplicadas a las proteínas del suero humano, efectuadas por el Profesor sueco de la universidad de Upsala, Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, por las que obtuvo el Premio Nobel de Química.

Las repercusiones de estos trabajos son mucho más amplias de lo que pueda suscitar su enunciado. Se generaliza la realización de los proteinogramas que informan, con técnica fácil y rápida, de los componentes proteicos del suero, la prealbúmina, la albúmina y de las globulinas alfa-1, alfa-2, beta-1 beta-2 y gama, y se analizan sus valores normales y patológicos relacionados con gran número de enfermedades. La técnica es aplicable a todos los fluidos biológicos de animales y plantas.

Las investigaciones de Tiselius sobre la adsorción y la electroforesis contri-

buyeron en gran medida al desarrollo de los métodos cromatográficos sobre papel, capa fina y columnas. Posteriormente se avanzó extraordinariamente en la electroforesis para la determinación del ADN y RDN, que llevaron al conocimiento del genoma humano en el año 2.000.

En los años 1954 y 1955, conseguimos una beca en la universidad de Münster in Westfalia en Alemania, y como dato curioso mencionaremos que en esos años sólo siete universitarios españoles estuvimos en el extranjero con becas de investigación, entre los cuales tres farmacéuticos de la Universidad Complutense de Madrid, coincidimos en Münster, Manuel Losada, quien fue Catedrático de Bioquímica de la Universidad de Sevilla y que obtuvo el Premio Príncipe de Asturias, Gonzalo Jiménez, quien fue Profesor de Investigación y Secretario General del C.S.I.C., durante un dilatado periodo de tiempo y, el tercero el que suscribe estas líneas.

El Profesor Tiselius impartió varias conferencias en la citada universidad, pudiendo asistir a las mismas, y quedamos impresionados por la sencillez y facilidad de expresión en los temas científicos que desarrolló. En Japón se recuerda al Profesor Tiselius todos los años, en convenciones relacionadas con la electroforesis, innovación tecnológica sin la cual no se podría haber investigado el ADN y en consecuencia el genoma humano y de los distintos seres vitales, como bacterias, virus, plantas y animales, todo ello apoyado en sistemas informáticos sofisticados.

Por coincidir nuestra estancia en Alemania con un gran fervor por las nuevas técnicas derivadas de las investigaciones sobre la electroforesis y la adsorción por Tiselius y su aplicación en los diferentes sistemas cromatográficos, como anécdota citaremos que realizamos uno de los primeros trabajos sobre cromatografía de papel acetilado, para la separación e identificación de los estrógenos urinarios, estrona, estriol y estradiol, comprobando que el estriol aumentaba considerablemente con el desarrollo del embarazo, lo que se relacionó con la vitalidad fetal, e interpretando su disminución con una anomalía o incluso muerte fetal. Los estrógenos están relacionados con los flavonoides por la similitud de sus estructuras, especialmente por su anillo A de tipo fenólico, similar a flavonoides como la genisteína y daidzeína.

La electroforesis sobre papel y la cromatografía sobre papel fueron las inno-

vaciones técnicas que más influyeron inicialmente sobre el aislamiento de las sustancias naturales, y por tanto en la metodología de los flavonoides.

En ambas técnicas se utilizaron los papeles de la marca Whatman nº 1, para pequeñas cantidades e identificaciones y el nº 3 para cromatografía preparativa, que permite separar grandes cantidades de sustancias. El papel de la marca Schlüssel fué también utilizado, pero con menos éxito que el Whatman. Se probaron distintos grados de acetilación en los papeles para cromatografía, encontrando los mejores resultados con un grado del 30%. Para la electroforesis los papeles acetilados dieron muy buenos resultados.

En 1956, se publica en España el primer trabajo de fracciones estrogénicas separadas por cromatografía sobre papel (Tomás Lorente, F, y Santos Ruiz, A.).

En 1965, se publica en España uno de los primeros trabajos sobre separación de flavonoides por cromatografía sobre papel (Tomás et al.)

Harborne publica en 1967 un interesante trabajo sobre la bioquímica de los flavonoides; en 1973 hace una revisión sobre los métodos fitoquímicos y en 1975 otra revisión que alcanzará gran fama, "The flavonoids".

En 1970, Mabry et al., publican el libro "The systematic identification of flavonoids", que conjuntamente con el publicado en 1975 por Mabry y Markham, "Mass spectrometry of flavonoids", fueron libros de consulta diaria para los especialistas en la investigación de flavonoides.

Markham, en 1975 y en 1982, publica dos libros, sobre el aislamiento e identificación de los flavonoides, que fueron manuales de consulta.

De 1973 a 1976, Tomás et al., hacen tres publicaciones sobre el estudio de la estructura de los flavonoides en el ultravioleta-visible.

Hacia 1950, comienzan a utilizarse la instrumentación espectrofotométrica, que pocos años después sería muy perfeccionada y desempeñaría una gran ayuda para conocer las estructuras de las sustancias orgánicas naturales y entre ellas la de los flavonoides, que se disolvían en medio metanólico para hacerles un barrido del visible al ultravioleta, cuyo procedimiento se llamó *estudio espectrofotométrico Visible-Ultravioleta*.

Los resultados de los flavonoides en su estudio Ultravioleta-Visible se complementaban con los resultados obtenidos de sus complejos metálicos y en medio alcalino.

La espectrometría de masas supuso un gran paso para conocer las estructuras de los flavonoides. Inicialmente se podía conocer el ión molecular y algunos fragmentos del mismo. Al emplear los derivados permetilados y perdeuterometilados fue posible analizar los compuestos hidrófilos y sus fragmentaciones de modo más perfecto.

La Resonancia Magnético Nuclear de Protones, complementó los resultados de la anterior técnica mencionada y se pudo analizar también los azúcares en los heterósidos. Inicialmente se necesitaban relativas grandes cantidades del compuesto a analizar, que se derivatizaban previamente.

Los avances tecnológicos que influyen en la investigación de los flavonoides, en la segunda mitad del siglo XX hasta el momento actual, los podemos enunciar sucintamente:

La cromatografía sobre papel en sus modalidades de ascendente, descendente y circular.

La cromatografía en capa fina, con distintos soportes de gel de sílice, celulosa, poliamida, agarosa, etc. (Tomás et al., 1970).

La cromatografía en columna, con distintos rellenos, entre otros de gel de sílice, poliamida, distintos tipos de Sephadex, amberlitas, etc. (Tomás et al., 1972, 1973).

La cromatografía gaseosa, para sustancias volátiles y derivados volátiles, que acoplada a la espectrometría de masas supuso un gran adelanto.

La espectrofotometría de infra Rojo (Tomás et al., 1973).

La espectrometría de masas normal y la de alta resolución, así como el empleo de los permetilados y perdeuterometilados (Tomás et al., 1982, 1986).

La difracción de rayos X.

La electroforesis sobre papel y en capa fina para la identificación de sulfatos y glucurónidos de flavonoides (Tomás y Ferreres, 1988).

La resonancia magnética nuclear de protones y la de Carbono 13.

Los logros más modernos e innovadores se han conseguido con sistemas de columnas cromatográficas de alta resolución en fase reversa, con detectores de red de diodos acoplados a espectrometría de masas y a la resonancia magnética nuclear de protones (Tomás Barberán et al., 1985).

Investigación de la estructura de los flavonoides

Reacciones de color: Pueden proporcionar una información inicial sobre la estructura del flavonoide, así como la presencia o ausencia de determinados sustituyentes. **Los vapores de amoniaco**, son muy empleados sobre los flavonoides extendidos en pequeñas tiras de papel, interpretando sus coloraciones del siguiente modo:

A: Coloración amarilla, amarillo-verdosa o verde, pueden corresponder a 5-hidroxi flavonas, o flavonoles con hidroxilo sustituido en C-3, con hidroxilo libre en C-4.

B: Si no se aprecia cambio de color o éste es muy débil, suele relacionarse con flavonas o flavonoles sustituidos en C-3 con hidroxilo libre en C-5 o con carencia de hidroxilo libre en C-4.

C: El color azul se relaciona con flavonas con hidroxilo sustituido en C-5.

D: El rojo y el naranja se relaciona con chalconas con hidroxilo libre en C-2 y /o hidroxilo libre en C-4.

EXPOSICIÓN EN LUZ UV DE ONDA LARGA A 360 NM:

A: El color amarillo o naranja fluorescente, que permanecerá inalterable con los vapores de amoniaco, se relacionan con flavonoles con hidroxilo libre en C-3.

B: El color amarillo fluorescente que cambia a naranja o rojo con vapores de amoniaco, se relacionan con una aurona con hidroxilo libre en C-4 ó de C-2 ó C-4 hidroxilchalconas.

C: El color amarillo- verdoso, azul- verdoso o verde, que cambian poco al someterlos a los vapores de amoniac, indican una aurona con hidroxilo libre en C-4 o una flavanona con hidroxilo libre en C-5. También pueden corresponder a flavonoles con hidroxilo libre en C-3 y con o sin hidroxilo libre en C-5.

REACCIÓN DE SHINODA O DE LA CIANIDINA:

Esta prueba para la detección de flavonoides consiste en añadir a una solución alcohólica de los mismos, **un trocito de magnesio y unas gotas de ClH** concentrado, obteniendo distintas coloraciones:

Flavonas: amarillo, rojo.

Flavonoles: rojo, magenta.

Flavanonas: rojo, magenta, violeta o azul.

Chalconas: amarillo, naranja, rojo.

Dihidrochalconas: de incoloro a amarillo débil.

REACTIVO DE NEU:

Es el éster aminoetílico del ácido difenil-bórico. Se utiliza disuelto en metanol al 1 %, con lo que se pulveriza a los flavonoides sobre papel, obteniendo distintas coloraciones:

3', 4'-dihidroxi flavonas y flavonoles: naranja.

4'-dihidroxi flavonas: amarillo verdoso.

PERMETILACIÓN CON DIAZOMETANO:

Se utiliza la reacción alcalina del flavonoide con el N-metil-N-nitroso-p-tolueno-sulfonamida, haciendo las manipulaciones bajo campana, con guantes protectores por ser reconocido su poder tóxico y cancerígeno (Markham, 1982).

El diazometano metila los hidroxilos libres del esqueleto del flavonoide, excepto el hidroxilo en C-5, que para metilarse precisa un leve aumento de la temperatura, facilitada con el calor de la mano enguantada. Los hidroxilos de los azucares no se metilan.

La realización técnica consiste en disolver en 10 ml de metanol una cantidad de sosa de aproximadamente unos 0.5 gramos; una vez enfriada la disolución alcalina, se añade el flavonoide disuelto en metanol o etanol y a todo lo anterior se agrega, poco a poco, el diazometano disuelto en metanol, que formará burbujas; una vez terminadas estas se deja el matraz unas 12 horas en la oscuridad. Seguidamente se pasa nitrógeno por la mezcla reaccionante, hasta sequedad. Se recomienda separar las fracciones permetiladas, con sistemas cromatográficos apropiados, como son las placas de gel de sílice, desarrolladas con acetato de etilo, o bien con una mezcla de cloroformo, metanol, acetona (5:4:1).

En su momento, el empleo del diazometano constituyó una gran ayuda para la caracterización de los flavonoides, por la pequeña cantidad de muestra necesaria, por su fácil realización y por la información que se obtiene sobre los hidroxilos en los anillos A, B y C, comparando cromatográficamente los permetilados obtenidos con patrones de distinta sustitución.

REACTIVOS ALCALINOS

Provocan una ionización de los hidroxilos libres, especialmente los de los C-3, C-4 y C-7, con curva muy desplazada hacia el visible (batocromía) y aumento de su intensidad (NaOMe y NaOA).

REACTIVOS METÁLICOS FORMADORES DE COMPLEJOS.

Los flavonoides pueden formar complejos metálicos de tipo quelato en determinadas condiciones, como son la presencia de hidroxilos libres, en las posiciones adyacentes al grupo carbonilo.

La existencia de un doble enlace entre las posiciones C-2 y C-3, desplaza la absorción de sus máximos hacia el visible, (Jurd, 1962, Harborne, 1964, Mabry, 1970, Serrano, 1975), produciendo un efecto de conjugación entre los anillos

A y B, que explica la interrelación de resonancia relativa entre dichos anillos, pudiendo considerarse interdependientes las respuestas de estos derivados.

ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE-ULTRAVIOLETA DE LOS FLAVONOIDES

Para poder explicar las respuestas espectrales de los flavonoides en el ultravioleta en relación con los distintos tipos de sustituyentes, Jurd, 1962, considera tres estructuras fundamentales: benzoilo (I), cinamoilo (2) y gama-pirona (III).

El **benzoilo** explica el comportamiento de los flavonoides con sustituyentes en el anillo A, preferentemente en el C-7, con respuesta espectral en la banda II.

El **cinamoilo** se explica el comportamiento de los sustituyentes en el anillo B, lo que se manifiesta preferentemente en la banda I.

La **gama-pirona** explica el comportamiento del sustituyente en C-5 y su relación resonante con el grupo carbonilo, con respuesta en la banda II.

Las flavanonas y los dihidroflavonoles no pueden adoptar dichas configuraciones al carecer de doble enlace en el C-2 y el C-3.

El espectro típico de los flavonoides muestra dos máximos de absorción, uno entre 240-280 nm, llamado banda II, relacionado con el sistema benzoilo y el anillo A. Otro máximo, entre 320-380 nm, llamado banda I, relacionado con el sistema cinamoilo y el anillo B.

Los desplazamientos de estos máximos y su intensidad relativa informan sobre la naturaleza del flavonoide y la localización de sus oxigenaciones.

La posición de la banda I nos permite conocer el tipo de flavonoide:

- De 304 -350 nm: Flavonas.
- De 328-357 nm: Flavonoles con el hidroxilo en C-3 copulado.
- De 352- 382 nm : Flavonoles con el hidroxilo en C-3 libre.
- De 320 (pico)-330 (inflexión): isoflavonas.

Otras connotaciones que permiten ampliar el conocimiento del grado de oxigenación:

La glicosilación o metilación en C-3, C-5 o C-4 se traduce en cambios hipsocrómicos, especialmente en la banda I. El bloqueo del hidroxilo en C-3 afecta a una hipocromasía de 12-17 nm, que pasa a ser de 22-25 si el hidroxilo en C-5 no existe o está bloqueado. La metilación del hidroxilo en C-5 experimenta una hipsocromía de 5-15 nm en la banda I y en la banda II. La copulación de hidroxilo en C-4 experimenta una hipsocromía en la banda I de 3-10 nm.

Las flavanonas con el heterociclo C saturado y consecuentemente con falta de conjugación entre los anillos A y B, muestran definidas respuestas en el ultravioleta y tienen una menor actividad antioxidante. Las flavanonas exhiben una fuerte absorción en la B II (270-295 nm) y sólo un hombro en la B I (326-327 nm).

En general los flavonoides con un solo sustituyente en el anillo B exhiben un pico (ca 270 nm) y los flavonoides di o tri-sustituídos en el anillo B, muestran un pico (ca 258 nm) acompañado de un hombro (ca 272 nm).

Según Vollenweber, 1981, el color de las antocianinas está relacionado con la posición y el número de sus hidroxilos. En la B I muestran un característico pico (450-560 nm) y en la B II un pico (240-280).

La estructura de los flavonoides ha sido muy estudiada por gran número de investigadores, entre otros por: Harborne, 1967, 1988, Harborne et al., 1975, Cadenas et al, 1996 y Marckham, 1982.

REACTIVOS ALCALINOS

METILATO SÓDICO:

En este medio, debido a su carácter marcadamente básico, los hidroxilos fenólicos están totalmente ionizados, por lo que se observa un efecto marcadamente batocrómico en la banda I con respecto a lo registrado en metanol (Tomás et al., 1973).

Los cambios batocrómicos en la banda I pueden ser:

- De 45-65 nm, manteniendo la intensidad se relaciona con el hidroxilo libre en C-4'.
- De 45-65 nm, decreciendo en intensidad, indica hidroxilo libre en C-3 y no en C-4'.
- Descomposición; con el paso del tiempo disminuye la intensidad del pico, indica agrupación polihidroxílica en 3-4' / 3-3'-4' / 5-6-7 / 5-7-8 / 3'-4'-5'. En medio alcalino se hidrolizan los hidroxilos fenólicos, quedando las cargas negativas muy próximas, que producen inestabilidad.

ACETATO SÓDICO:

Es una base más débil que el metilato sódico y por tanto sólo ioniza los hidroxilos más ácidos (C-3, C-5, C-7).

Los cambios observados en la banda II. están relacionados :

- Hidroxilo libre en C-7: Batocromía de 5-20 nm. La presencia de grupos oxigenados en C-6 ó C-8 reduce estos desplazamientos.
- Presencia de hidroxilos conjuntos en 5.6.7/ 5,7,8/ y 3,3'.4', descomponen la curva con el tiempo, mostrando una disminución de absorbancia (Mabry, 1976).

REACTIVOS METÁLICOS /BASES DÉBILES.

ACETATO SÓDICO/ ACIDO BÓRICO:

Para la detección de grupos orto-hidroxílicos, excepto en C-5 y C-6, forman quelatos con el ácido bórico, que se traduce en un desolazamiento en la banda I:

- Batocromía de 12-30 nm, si el quelato está en B.
- Batocromía de 5-10 nm, si el quelato está en A (Mabry, 1970).

TRICLORURO DE ALUMINIO Y TRICLORURO DE ALUMINIO/ CLH:

Las flavonas y flavonoles con hidroxilo libre en C-3 o C-5 forman complejos estables.

Los grupos orto-dihidroxílicos forman complejos que se descomponen con el ácido. Se interpreta por su respuesta hipsocrómica en la banda I:

- De 30-40 nm: agrupación orto-dihidroxílica en el anillo B.
- De 20-25 nm: agrupación orto-dihidroxílica en el anillo A.
- De 20 nm o menos: sistema pirogálico, tres grupos hidroxílicos adyacentes en el anillo B.

Si después de la adición del ácido se observa un desplazamiento batocrómico en la banda I, es debido a la presencia de hidroxilos en C-3 y/o C-5 que expresa:

- De 35-55 nm: hidroxilo libre en C-5.
- De 50-60 nm: hidroxilo en C-3 (con o sin -OH en C-5).

La presencia de hidroxilos en C-8 y en C-6, muestran la siguiente batocromía en la banda I:

- De 55-75 nm: presencia de -OH en C-8.
- De 25-30 nm: presencia de -OH en C-6.
- De 16-23 nm: presencia de metoxilo en C-6.

(Sakakibara y Mabry, 1978).

CLORURO DE NIQUEL / ACETATO SÓDICO:

En medio alcohólico se forman complejos en las flavonas y flavonoles, entre el grupo carbonilo en C-4 y el grupo hidroxilo en C-5; se observa en la banda I: hipsocromía cuando se trate de flavonas y flavonoles copulados en C-3; batocromía si el -OH en C-3 está libre. En adición de aceta sódico, las respuestas muestran batocromía muy discreta, si existe OH libre en C-5 (Tomás y Ferreres, 1976).

Espectrometría de masas aplicada a flavonoides

Para la elucidación estructural de los flavonoides muy hidroxilados y glucosilados, se han utilizado diferentes derivados conseguidos por métodos químicos, como son los acetilados, los trimetilsililados, los parcialmente metilados y etilados con el empleo del diazometano y diazoetano, los isopropileno derivados, y los permetilados y perdeuterometilados que son los mayormente empleados.

Las agliconas de las flavonas fueron utilizados en primer lugar con esta técnica. Los trabajos primeros fueron debidos a Audier, 1966 y a Kingston, 1971. Posteriormente Tomás et al., 1982, 1986, y Tomás Barberán et al., 1986, hicieron interesantes comunicaciones sobre los derivados permetilados y perdeuterometilados, así como un estudio de la fragmentación Retro Diels-Alder.

La espectrometría de masas de impacto electrónico consigue dos tipos de información:

- La determinación del ión molecular que permite conocer el número de sustituyentes en el esqueleto flavónico, su naturaleza y su peso molecular.
- El análisis de los picos de fragmentación de la molécula informa con precisión sobre la situación de los sustituyentes en los anillos A, B y C del flavonoide.

Existen extensísimos estudios sobre la característica de los picos derivados del ión molecular M^+ , entre los que citamos:

- M-14 ($M-CH_2$), en flavonas, flavonoles y 3-metoxiflavonas.
- M-15 ($M-CH_3$), en metoxiflavonas en posiciones 3,6 o 8.
- M-17, en las 2',3 dihidroxiflavonas.
- M-18, en metoxiflavonas en posiciones 3 o/y 5.
- M-19, sólo en metoxiflavonas en 3 y 5.
- M-28, en los derivados metilendioxi.
- M-29, en metoxilados en 6 con $-OH$ en 3 y 5.

- M-31, en metoxiflavonas en 2'y3.
- M-43, en metoxiflavonas en 3,6 u 8.
- La fragmentación Retro Diels-Alder, proporciona picos muy importantes, como son los que caracterizan al anillo A (A·, A-15, A-28, A-43, A-58, A-71) y al anillo B (B·, B-15, B2, B2-15, B2-28).

La Resonancia Magnética Nuclear de Protones, aplicada a los flavonoides

Por medio de esta instrumentación se han conseguido extraordinarios resultados para la identificación estructural de los flavonoides. Ofrecen especial importancia los trabajos de Markham y Mabry (1975) sobre este tema.

La técnica en sí consiste en analizar las señales producidas por la resonancia de los protones que están influenciados por los protones vecinales.

Algunas de las posibilidades de esta instrumentación son:

- Análisis de grado de oxidación de los anillos de los flavonoides.
- Número de metoxilos y su localización.
- Apreciación del carácter del flavonoide: Flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles y otros.
- Conocimiento del número de azúcares y la unión entre ellos.
- Detección de las cadenas de hidrocarburos con uniones -O ó -C, como los isoprenilos.

La RMN-H₁ muestra sus señales preferentemente en el rango de 0 a 10 p.p.m.

Respuestas más bajas están relacionadas con los protones de los hidroxilos y suelen mostrarse entre 11 y 14 ppm.

Otra importancia característica de las señales de los protones es la proporcionalidad de sus áreas en relación con el número de protones.

Ballantine y Phillinger (1997), interpretan las señales relacionadas con diferentes radicales, utilizando los derivados TMS en Cl_4C analizando los protones en orto, meta y para relacionados con sustituyentes como: -OH, -CH₃, -OCH₃, -CH₃, -CO₂H, -CH=CH-R, ácidos polifenólicos y otros sustituyentes. Estudian las señales en relación con la presencia o ausencia de cada radical.

La estructura del anillo C de los flavonoides se interpreta por las señales de los protones.

Flavonas: muestran un singlete a 6,3 ppm.

Flavanonas: exhiben señales de multiplete de 2,6 a 2,8 ppm.

Dihidroxi flavonoles: doblete en torno a 4,2 ppm.

Isoflavonas: singlete a bajo campo, aproximadamente a 7,7 ppm.

La estructura del anillo A de los flavonoides se interpreta por señales determinadas de sus protones.

Copulación en C-5 y C-7. Protón en C-6: doblete de 6,2 a 6,4 ppm. Protón en C-8: doblete de 6,4 a 6,6 ppm.

Copulación en C-7. Protón en C-5: doblete a 8 ppm., con acoplamiento en orto a 9 Hz.

Protón en C-6: doblete de agrupación meta ($J=2,5$ Hz), a 7,7 ppm.

Protón en C-8: doblete de agrupación meta ($J=2,5$ Hz), de 7,5 a 7,6 ppm.

Copulación en C-5, C-6 y C-7: singlete a 6,5 ppm.

Efecto de glicosilación en C-7: dobletes de H 6 y H 8, 0,2 ppm. hacia campo inferior.

Efecto de glicosilación en C-3: similar respuesta que en anterior, pero con ausencia del singlete en C-3.

La estructura del anillo B de los flavonoides se interpreta por respuestas características.

Sustitución copulada en 4':

Doblete de 7,6 a 7,8 ppm ($J=9$ Hz) (H 2' y H 3').

Doblete de 6,6 a 6,9 ppm ($J=9$ Hz) (H 5' y H 6').

Sustitución copulada en 3' y 4':

Doblete de 7,2 a 7,4 ppm ($J=9$ Hz) (H 2' y H 6').

Doblete de 6,6 a 6,8 ppm ($J=9$ Hz) (H 5' y H 6').

Sustitución copulada en 3', 4' y 5':

Singlete de doble protón de 7,2 a 7,3 ppm.

RESONANCIA MAGNÉTICA DEL CARBONO 13, APLICADA A FLAVONOIDES

Está basada en la abundancia de este carbón que es tan sólo un 1,1 % del carbono total.

Las señales de esta resonancia se encuentran entre 0 y 200 ppm., con control de TMS. La resonancia de cada carbono se traduce en una respuesta específica a un determinado ppm., pero a diferencia de la resonancia de protones, las señales no se traducen en abundancias precisas, por lo que son poco empleadas.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) ACOPLADA A LA DETECCIÓN ULTRAVIOLETA -VISIBLE CON DIODO EN SERIE ACOPLADO A ESPECTRÓMETRO DE MASAS CON TRAMPA DE IONES

Es una técnica analítica con el objetivo de separar compuestos químicos de un complejo de naturaleza mixta.

El sistema de inyección puede ser manual o automático. El primero permite trabajar con muestras con un volumen fijo. El automático permite la inyección seriada de muestras.

Dispone de una bomba para impulsar tanto la fase móvil como la muestra y de un sistema degasificador para eliminar gases disueltos en los líquidos.

Una de las partes más importantes del HPLC es la columna revestida de camisa de acero para soportar altas presiones y está rellena en su interior

de la fase estacionaria, que varía en función del mecanismo por el cual las moléculas son separadas. Las hay de adsorción, de partición, de intercambio iónico y de exclusión por el tamaño molecular. La más empleada es la de fase reversa, que separa por partición y algo de adsorción mediante los grupos silanol no-protégidos que lleva. Los compuestos a analizar son retenidos por la fase estacionaria menos polar y avanzan por la columna en función de la concentración de la fase móvil polar que la atraviesa.

Los sistemas de detección están condicionados por las características física y químicas de los analitos, siendo los más utilizados el detector ultravioleta-visible con diodos de serie, el detector de fluorescencia, el detector de índice de refrigeración, el detector electroquímico y la espectrometría de masas (con cuadrupolo o trampa de iones).

Para el análisis de flavonoides se usan equipos con detector de diodos en serie con lámpara ultravioleta-visible acoplados a la espectrometría de masas con trampa de iones. La detección ultravioleta-visible permite en una primera fase **analizar los compuestos sin destruirlos, dando una información primaria muy estimable**, puesto que los máximos de adsorción a determinadas longitudes de onda están directamente relacionados con la estructura química del compuesto analizado.

Complementando el sistema analítico anterior, la espectrometría de masas nos informa del peso molecular del compuesto que se trate y de información complementaria sobre el mismo.

El nivel de **sensibilidad es de picogramos, por lo que se pueden analizar pequeñísimas cantidades** de cada compuesto. El sistema está planificado para un amplio rango de compuestos como son los medicamentos, compuestos fenólicos y por consiguiente los flavonoides, las vitaminas, los azúcares, las proteínas, los pesticidas, los herbicidas, y un amplio etc., como son los metabolitos en el plasma, en la orina y en fluidos biológicos en general, constituyendo un sistema ideal para el análisis de los estupefacientes y anabolizantes en humanos, tanto a nivel deportivo (**nandrolona, EPO, testosterona, etc.**) como a nivel penal (**heroína, anfetaminas, cocaína, etc.**). Está disponible además para todos los análisis bioquímicos (glucosa, colesterol, bilirrubina, triglicéridos, ácido úrico, etc.).

El sistema instrumental HPLC, con espectrometría visible-ultravioleta y acoplado a espectrometría de masas, permite una información muy completa y fiable de los metabolitos secundarios y en concreto de los flavonoides, aunque sea en trazas, partiendo de material vegetal sin tratamiento previo.

El sistema expuesto es lo más avanzado y fiable que se conoce para la detección de flavonoides y una amplia gama de metabolitos secundarios.

BIOACTIVIDAD DE LOS FLAVONOIDES

Una de las propiedades más destacable de los flavonoides es su poder antioxidante y neutralizador de radicales libres. El té verde tiene singular importancia como antioxidante debido a su contenido en catequinas y diferentes flavonoides, por lo que ha sido objeto de numerosas investigaciones, tales como las de Benzie et al., 1999, Chen et al., 1995, Clifford et al., 1997, Khan et al., 1992, Keli et al., 1996, Jovanovic et al., 1998, Cadenas et al., 1996; la miel también tiene flavonoides antioxidantes, Frankel et al., 1998; Brown et al., demuestran que la presencia de flavonoides formando complejos con Cu^{2+} , potencia la actividad antioxidante.

Los radicales libres son compuestos que disponen de un electrón desapareado que tiende a atacar un enlace covalente de algún constituyente especialmente dentro del núcleo de la célula o relacionado con la misma, como puede ser un fragmento del ADN. Si el ataque del radical libre prospera contra un compuesto que tenga un enlace covalente, este se convertirá a su vez en otro radical libre que tenderá a atacar a otro compuesto que contenga también otro enlace covalente y así podría seguir ininterrumpidamente, provocando el envejecimiento de las células hasta desembocar en su destrucción o muerte.

El inicio de los radicales libres está en la **formación del anión superóxido (O_2^-)**, extremadamente activo y corrosivo que tiende a atacar y destruir un enlace covalente de algún constituyente celular que se convertirá a su vez en otro nuevo anión dispuesto a atacar a otro constituyente celular y así sucesivamente.

En el organismo el oxígeno es el aceptor ideal de electrones en los sistemas de transporte electrónico, para generar energía de modo muy rentable, aceptando cuatro electrones y cuatro protones que conducen a la formación de agua, pero este proceso se complica cuando el oxígeno acepta un único electrón y se convierte en el peligroso anión superóxido.

En un organismo animal el anión superóxido se genera de variadas formas: por pérdida de electrones al actuar la enzima citocromo-oxida para formar

agua; en las mutaciones del ADN mitocondrial en donde se producen algunas fugas de electrones; por la acción de ciertas oxidasas que pueden generar pequeñas cantidades de agua oxigenada; por la oxidación de la hemoglobina que pasa a metahemoglobina; por la acción de los fagocitos cuando engloban bacterias o virus y por la acumulación de neutrófilos.

El organismo se defiende de los radicales libres y de otras estructuras oxigenadas peligrosas, por variados procedimientos:

Por la acción del ácido úrico, la bilirrubina, la albúmina, y otros metabolitos que actúan como antioxidantes.

Por las enzimas catalasa, que destruyen toda presencia de agua oxigenada.

Por la enzima glutatión peroxidasa que debido a su grupo tiólico libre funciona como agente reductor, desactivando los peróxidos por caminos no enzimáticos.

La defensa del organismo contra los radicales libres encuentra extraordinariamente auxiliadas con los antioxidantes naturales contenidos en determinadas frutas y hortalizas, siendo sus máximos representantes las vitaminas E y C, lípido e hidrosolubles respectivamente, los flavonoides muy extendidos en frutas y hortalizas muestran una gran actividad antioxidante; un potente antioxidante derivado de los flavonoides de la uva negra es el resveratrol.

Los flavonoides como derivados fenólicos que son, disponen de dobles enlaces conjugados en su estructura, que les hace ser muy atractivos para los radicales libres que tienden a penetrar en ellos, neutralizándolos o convirtiéndose en radicales libres. Para su actuación como antioxidantes intracelulares precisan tener carácter lipófilo, lo que ocurre con la mayoría de las agliconas de los flavonoides, pero también pueden tener carácter lipófilo ciertos metabolitos que se obtienen de los flavonoides, para poder pasar la doble membrana celular e instalarse en el núcleo celular en donde podrán ejercer su acción antioxidante. Si el flavonoide es atacado una o varias veces por radicales libres, puede cambiar su condición de lipófilo a hidrófilo o parcialmente hidrófilo, con lo que sería expulsado del núcleo y migraría a la zona de la doble membrana celular o fuera de ella donde está la vitamina C y otros metabolitos de carácter hidrófilo como el ácido úrico que muestran un fuerte carácter reductor que

les permite neutralizar a los radicales libres. Una vez “limpiado” de los radicales libres, la estructura del flavonoide o el metabolito derivado de él, vuelve a recuperar su carácter lipófilo, que le predispone a penetrar nuevamente en la célula para incorporarse más tarde al núcleo.

Los metabolitos secundarios en general y los flavonoides en particular, pueden sufrir grandes variaciones en su estructura debido a diferentes factores o influencias relacionadas con la digestión, como anteriormente dijimos. Así es conocida la conversión de las flavanonas en chalconas en un medio alcalino; por influencia enzimática los glicósidos de flavonoides pueden convertirse en sus agliconas; por influencia bacteriana, sobre todo en el intestino delgado, los flavonoides pueden pasar a derivados fenólicos; en el hígado se forman los glucurónidos. Estas transformaciones tras la ingesta, pueden condicionar el comportamiento bioactivo y farmacológico de los metabolitos secundarios. Gracias a las nuevas tecnologías analíticas de HPLC, es posible estudiar estos cambios durante la digestión, pero todavía no se ha avanzado lo suficiente como para conocer todos ellos y por tanto su actuación en los receptores celulares, para lo que sería preciso disponer de los anticuerpos monoclonales específicos, que permitiera investigar en el sistema nervioso central la presencia de los metabolitos secundarios, que nos indicaran en qué órganos o partes corporales se encuentran.

Según lo expuesto hasta este momento, en los antioxidantes podemos distinguir dos grandes grupos, los que actúan intracelularmente y que muestran carácter lipófilo, como son la vitamina E y determinados flavonoides o derivados de ellos, de carácter lipófilo, que tienen una extraordinaria importancia por ser los defensores del ADN y como consecuencia mantienen joven a las células y los que actúan extracelularmente, como son la vitamina C, el ácido úrico, los derivados tiólicos y un gran conjunto de sustancias orgánicas vegetales, de carácter hidrófilo, entre las que debemos mencionar el té verde, el vino tinto, el chocolate, las frutas y hortalizas que contengan flavonoides, las catequinas y los polifenoles y sustancias con dobles enlaces conjugados, según Amorowicz et al., 1995, Arts et al., 2000^a y 2000^b, Balentine et al., 1997, Clifford et al., 2000, Khan et al., 1992. Zhu et al., 1999, aprecian regeneración plasmática del a-tocoferol, por las catequinas del té verde.

Los antioxidantes hidrófilos son de extraordinaria importancia, pues permiten la regeneración de los antioxidantes intracelulares.

FARMACOLOGIA DE LOS FLAVONOIDES

Las acciones farmacológicas de los flavonoides son variadas y están relacionadas con sus respectivas estructuras. El primer paso a considerar en los humanos y en los animales es la absorción de los flavonoides en el trayecto gastro-intestinal y su excreción por la orina, las heces, sudor, etc., (Cook y Samman, 1996). En el proceso digestivo los flavonoides pueden metabolizarse de diferente forma según sea su estructura y el agente transformador que intervenga. Las bacterias del colon transforman el anillo heterocíclico de los flavonoides, degradándolos a ácidos fenólicos, que pueden ser absorbidos, conjugados o metabolizados posteriormente por otras bacterias antes de su excreción (Peterson y Dwyer, 1998). Algunos flavonoides pierden con facilidad sus azúcares por influencia enzimática (Day et al. 1998), Stenlid, G., analiza la actividad fisiológica de las flavonas atendiendo a los sustituyentes del anillo A.

Podemos clasificar las acciones farmacológicas de los flavonoides en los siguiente grupos:

- 1.- Vasoprotectores.
- 2.- Modificadores de los niveles del colesterol y lípidos.
- 3.- Antiagregantes.
- 4.- Modificadores enzimáticos.
- 5.- Actividad estrogénica.
- 6.- Actividad anticancerígena.
- 7.- Actividad antibacteriana y antifúngica.
- 8.- Actividad antiurémica.
- 9.- Actividad espasmolítica.
- 10.- Actividad antialérgica.

11.-Actividad antiinflamatoria.

12.-Actividad antivírica.

1.- Vasoprotectores

Algunos autores denominan "factor P" o "vitamina P", a aquellos flavonoides que disminuyen la permeabilidad capilar y aumentan su resistencia, ejerciendo así una acción protectora sobre los vasos sanguíneos (Isieyev, 1970; Go et al., 1974), por lo que se aplicaron en los casos de accidentes hemorrágicos, púrpuras, hematomas, edemas, varices, etc.,... (Bennko et al., 1977; Del Pozo, 1977).

Los flavonoides son agentes economizadores del ácido ascórbico ya que aceleran la reacción que transforma el ácido dehidroascórbico en ácido ascórbico, actuando como intermediario el glutatión (Emiko et al., 1981).

El ácido ascórbico interviene a su vez en la síntesis correcta del colágeno, ya que es necesario para que se produzca la hidroxilación de la lisina y la prolina, obteniéndose hidroxilisina e hidroxiprolina, sustancias indispensables para la síntesis del colágeno (Ronzier et al. 1981).

Se estudiaron la influencia de algunos flavonoides en la reticulación de las fibras del colágeno. La dihidroquercetina, la rutina, la naringenina y las catequinas favorecen la solubilidad y estabilidad de las fibrillas del colágeno, así como la **formación de muchos enlaces cruzados entre las fibrillas**, que pueden **explicar la acción protectora del colágeno en determinadas enfermedades**, como el latirismo (Cetta et al. 1971).

El carácter vasopresor de gran número de flavonoides ha incentivado la fabricación de distintas formas farmacéuticas como las obtenidas a partir de la rutina, así el Ruticé forte en comprimidos, el Farmatón Complex en cápsulas, y en comprimidos, el Epistaxol solución y en espray protector de las encías, el Gingilone pasta para proteger las encías, el Gingilone nasopomada, etc.,. Los obtenidos utilizando la hesperidina, como el Flavonoid de Abelló en polvo, el Daflon comprimidos, el Hidropolivit mineral comprimidos, el Diosmenin comprimidos, el Insiven comprimidos. Y otros como la Hidrosmina en cáps-

sulas y para uso tópico, la Troxerutina en cápsulas y en gel tópico, todos ellos empleados como protectores capilares y como antivariicosos.

2.- Modificadores del nivel del colesterol y lípidos

Es lógico pensar que **los flavonoides**, debido a su carácter vitamínico P, **muestran influencias sobre el colágeno que es imprescindible para la normalidad** de los **capilares y vasos sanguíneos**, puedan mostrar una acción directa sobre la **formación de ateromas y los niveles sanguíneos del colesterol y lípidos**.

La metil-chalcona de la hesperidina tiene un carácter hipocolesterolmiante (Szabo et al. 1970).

Los flavonoides muestran acciones beneficiosas en la arterioesclerosis (Kazabo, et al. 1981).

Myasnikow y Kasatrina 1970, evidenciaron que los flavonoides muestran actividad lipolítica y tienen discretas acciones hipolipemiante e hipocolesterolmiante.

3.- Antiagregantes

Se ha comprobado la disminución de la adhesividad de las plaquetas en los casos de trombosis (Hiladovec, 1977).

Las flavonas altamente metoxiladas, como la sinenserina y la tangeretina, muestran una gran actividad antiagregante (Robins et. al. 1971).

4.- Modificadores enzimáticos

Son numerosos los trabajos en donde se describe la acción de los flavonoides sobre numerosas enzimas (Mirisalikowa y Pakudina, 1977; Stenlid, 1979).

La ATP asa, es la enzima de la respiración, cuya relación con los flavonoides ha sido más estudiada. La rutina y los catecoles inhiben el ATP asa mitocondrial. La quercetina y otros flavonoles inhiben las células tumorales.

Los flavonoides se han estudiado como anticancerígenos, encontrando en muchos casos una relación entre la inhibición enzimática específica, como es el comportamiento frente a la telomerasa, y la inhibición y la apoptosis de las células tumorales.

El potencial anticancerígeno de los flavonoides se relaciona con el poder inhibidor de los mismos de ciertas enzimas como son: Las ADN topoisomerasas I y II; la tirosina cinasa; la cinasa ribosómica S6 y las aromatasas, todas implicadas en la diferenciación y el crecimiento celular, (Chian et al., 1978, Clifford et al., 2000, Coney et al., 1992, Mayo JI. 1998 y Gambaccian M. et al., 1997, Sawa et al., 1999, Steinmetz et al., 1996, Tijburg et al., 1997, Wang et al, 1992, Watenberg et al, 1970).

5.- Actividad estrogénica

Esta actividad está especialmente representada por las isoflavonas contenidas en la soja, la genisteína y la daidzeína, comprobándose con abundantes estudios epidemiológicos la menor incidencia del cáncer de mama y ovarios en las mujeres posmenopáusicas, y se tiene que considerar su estudio como una faceta más de los anticancerígenos.

En el año 1984 Milstein y Koholer obtuvieron el Premio Nóbel por haber encontrado la forma de obtener los anticuerpos monoclonares, que influyeron rápidamente en el reconocimiento de los receptores celulares así como de moléculas extrañas al sistema inmunológico y abrieron una enorme posibilidad de aplicaciones, entre ellas contra el cáncer y poder aplicar la Terapia de Sustitución Hormonal, que utiliza como referencia el 17-beta estradiol y estudia los fitoestrógenos como la genisteína, la daidzeína y otros flavonoides.

6.- Actividad anticancerígena

Antes de considerar la actividad anticancerígena de los flavonoides en general, es *conveniente recordar que el cáncer, es un conjunto de enfermedades como consecuencia de la pérdida del control normal de los procesos de la división celular, dando lugar a un creciente número de células, influenciadas por una potente acción de la enzima telomerasa y las enzimas relacionadas con ella, debiendo considerar en cada caso de cáncer específico una serie de cambios característicos entre los distintos tipos.*

En las alteraciones oncogénicas que dan lugar al cáncer, se deben diferenciar los oncogenes malignos que conllevan a la división incontrolada de células, de los oncogenes deficitarios, por pérdida de genes funcionales protectores de la división celular incontrolada, que por sí mismos no dan lugar al cáncer, de no activarse los oncogenes. Entre los genes supresores de tumores los más conocidos son el del retinoblastoma, el gen 53 y los genes de reparación del ADN.

Las propiedades anticancerígenas de los flavonoides es algo reconocido y existen abundantes investigaciones sobre ello. Se pueden distinguir tres clases de investigaciones:

INVESTIGACIONES IN VITRO, INVESTIGACIONES CON ANIMALES Y ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

En las investigaciones in vitro, generalmente se utilizan células cancerígenas puras, con las que se estudia el poder inhibitorio enzimático de los flavonoides y la apoptosis.

Un estudio especial in vitro es el realizado con tejidos tumorales humanos, y en especial el carcinoma 9KB de nasofaringe, cuyo crecimiento fue inhibido por los extractos de *Eupatorium altissimum*, *Eupatorium semiserratus* y *Baccharis sarathroides*, según Kupchan et al, 1969a; Kupchan y Babershis, 1971; Kupchan et al, 1969b.

En ratones ha sido muy empleado el benzo alfa pireno que produce el adenoma pulmonar de ratón; también se han reproducido en ratones otras alteraciones como es la leucemia linfocítica P-388 y el carcinoma de pulmón

de Lewis. Diferentes flavonoides se han empleado para inhibir cada una de estas tres formas de cánceres provocados en ratones, encontrando que determinados flavonoides eran muy activos, como la 3,5,7,3',4'-pentametoxiflavona según Watenberg y Leong, 1970. Muchas flavonas, especialmente las metoxiladas han sido empleadas para combatir los cánceres provocados en ratones. Chian y Silva, 1978, llegan a la conclusión que las flavonas muy metoxiladas son los flavonoides que presentan mayor actividad antitumoral y algunos glicósidos como la quercetetrina, patuletrina y rutina, pueden presentar actividad, pero más reducida.

De los estudios anticancerígenos de los flavonoides, el que ofrece mayor fiabilidad es el epidemiológico.

La epidemiología moderna se sirve de los estudios de cohorte como una gran estrategia para observar la salud o la enfermedad de una amplia población.

Un caso especial digno de mención es el de la epidemiología del cáncer de colon en relación con el ácido acetilsalicílico, que tiene de común con los flavonoides el estar formado por una estructura fenólica. Los hechos ocurrieron del siguiente modo: en 1976 la universidad de Harvard inicia un estudio epidemiológico de cohorte, con más de 121.000 enfermeras tituladas en EE.UU., con edades entre 30 y 55 años, para observar los factores que influían en el cáncer de mama y las enfermedades cardiovasculares, en el transcurso del tiempo.

Posteriormente se amplió el cuestionario con más preguntas, para comprobar si el tipo de dieta, el ácido acetilsalicílico y otros medicamentos, podrían relacionarse con alguna disfunción o con algún tipo de cáncer y en concreto con el de colon.

Giovanucci y colaboradores, en 1995 publican en el England Journal of Medicine de Boston, las siguientes conclusiones: 10 años con hábito muy frecuente de tomar aspirina, se asocian a una disminución de 37 % en el riesgo de padecer cáncer de colon. Tras 20 años de consumir aspirina el riesgo se reduce al 44 %, en relación con las mujeres que nunca tomaron aspirina.

Investigaciones posteriores, observaron que la aspirina produce la apoptosis (en griego "caída de la hoja", en biomedicina inactividad celular o muerte)

en líneas de células de cáncer de colon. Se descubrió que la aspirina tiene capacidad para inhibir el enzima COX-2, presente en las líneas de células del cáncer de colon.

7. Actividad antimicrobiana y antifúngica

Los extractos de agliconas de flavonas suelen mostrar actividad antibacteriana pero a concentraciones elevadas en comparación con los antibióticos. Tal ocurre con la 5 hidroxí-7.4'-dimetoxiflavona, que inhibe el crecimiento de algunas bacterias y desmatofitos, Odewiyil, 1982.

Ramaewamy et al,1972, encontraron que la morina, la naringenina y la hesperetina, eran activos frente al *Stafilococo aureus*, la *Escherichia coli* y el *Bacilo tyfosus*.

El extracto etéreo de la *Sculletaria baicanlensis* (labiada), mostró marcada actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas (*Sarcina lutea*, *Bacilus subtilis* el *Statafilococus aureus*). Kubo et al,1981, aislaron de dicha planta siete compuestos, destacando entre ellos la baicaleina (5,6,7 trihidroxí-flavona), que mostraba actividad antibacteriana frente a las bacterias citadas a la concentración de 250 nanogramo/ml.

Mitscher et al, 1983, aislaron de la *Glycirrhiza lepidota*, dos flavonas, la glabranina y la pinocembrina y los flavonoles glepidotin A y B, que mostraron una gran actividad antimicrobiana, de 25 nanogramos/ml, frente al *Stafilococo aurerus*, *Mycobacterium smegmalis* y *Cándida albicans*.

Es de destacar que la presencia de grupos isoprenoides en los flavonoles citados y en la flavona glabranina son los responsables de la actividad antifúngica y antibacteriana.

Villanueva et al.,1970, aislaron en la resina de própolis el flavonoide pinocembrina, la 5-7-dihidroxiflavona que conjuntamente con la galangina conceden a la resina de una actividad bacteriostática importante. Puede existir el fenómeno de potenciación en la actividad farmacológica, pero es posible que sean también otros derivados fenólicos los que intervengan en dicha poten-

ciación, como puede ocurrir en el caso de la mencionada resina, que inhibe al bacilo subtilis a una concentración de 0,03 nanogramos/ml.

8.- Actividad antiurémica

Un medicamento, el Lespenefril gotas, fue muy empleado durante bastantes años por su efectividad para disminuir la cifra de la urea en sangre y estaba constituido a base de un flavonol contenido en la Lespedeza capitata, planta japonesa.

En las hojas, savia y corteza de la Betula alba, contienen el 3-quercetol-galactósido, con propiedades antiurémicas y antiuricémicas.

9.-Actividad espasmolítica

Kahdzay et al,1966, deducen que las agliconas de flavonoides con hidroxilos en C-5 y C-7, muestran mayor actividad antiespasmódica.

Dare et al,1975, encuentra la acción bloqueante beta-adrenérgica en algunos derivados sintéticos de flavonas que llevan la cadena básica del propanol sobre el anillo B.

10.-Actividad antialérgica

Feutrew y Comperts, 1977, observaron que ciertas flavonas como la quercetina y la fisetina interfieren en la actividad de las ATP asas situadas en las membranas, incluyendo las calcio dependientes, que están asociadas con la movilización del calcio desde el citosol de las células y actúan incrementando la eficiencia del transporte de iones produciendo consumo de ATP.

La fisetina y la quercetina seguidos de la morina y el kaempferol, previenen la secreción de la histamina como respuesta a un antígeno.

11.- Actividad antiinflamatoria

Mabry y Ulumbelen, 1980, ensayaron la actividad antiinflamatoria, por el método de Hungar, en una solución de flavonoides cítricos, encontrando que la mayor actividad era debida a las fracciones de flavonoides solubles en agua.

VILLAR et al,1982, encuentran flavonoides provenientes de las sideritis con acciones antiinflamatorias; en general suelen ser derivados muy metoxilados.

12.-Actividad antivírica

Li et al., 2000, han encontrado en el flavonoide baicaleina actividad inhibidora del virus del VIH-I.

Otros flavonoides, encontrados en la flora panameña, muestran igualmente propiedades antiviricas, según el Profesor Mahabir P. Gupta, de la universidad de Panamá.

CONCLUSIÓN FINAL

Se ha expuesto la evolución científica y tecnológica ocurrida desde mediados del siglo XX hasta nuestros días, que han afectado a los flavonoides, desde su aislamiento hasta su determinación estructural, sin olvidar su bioactividad y farmacología.

Cuatro científicos intervinieron de modo relevante, en este tiempo:

En primer lugar el húngaro Profesor Szent-Györgi, quien fue el auténtico promotor del estudio de los flavonoides al haber encontrado la vitamina P con acción farmacológica lo que incentivó al estudio de los mismos. Fue considerado como el primer bioquímico del siglo XX y el creador de la biología celular. Tuvo una gran intuición científica al advertir una relación entre la vitamina C y los flavonoides. Igualmente consideró a los complejos metálicos de los flavonoides con unas características bioactivas de primer orden en los procesos vitales.

En segundo lugar el Profesor Tiselius, que hizo posible la aplicación de la electroforesis y los sistemas cromatográficos, que revolucionaron la tecnología científica, entre otros para los flavonoides.

Completan el cuarteto, el Profesor Milstein y el Profesor Kohler, por sus investigaciones sobre los anticuerpos monoclonales, que facilitó la localización de los receptores celulares de gran número de compuestos orgánicos, como hormonas, vitaminas, flavonoides y estrógenos que hizo posible la Terapia de Sustitución Hormonal, e influyó en las investigaciones de diferentes especialidades médicas, como la inmunología y el cáncer.

Al finalizar, a los dignos Académicos y a todas las señoras y señores aquí presentes, les doy mis más efusivas gracias.

DISCURSO DE CONTESTACIÓN AL EXCMO. SR. DR. D.
FRANCISCO TOMÁS LORENTE PRONUNCIADO POR EL
EXCMO. SR DR. D. LUIS CEPEDA MUÑOZ

Excelentísimo señor Presidente

Excelentísimos e ilustrísimos señoras y señores académicos

Señoras y señores

En la primera ocasión que hablé en esta Academia, lo hice comenzando mi discurso con estas tres palabras:

“Un gran honor”

Entendía, que en efecto era un gran honor el que se me confería al permitir dirigirme a tan selecto auditorio con motivo de mi ingreso en esta Real Academia de Doctores de España.

Hoy, he de comenzar de igual manera, poniendo en las palabras mayor énfasis, si es posible, ya que el honor aumenta al haberme designado para contestar en nombre de la Academia al discurso de ingreso como Académico Numerario del Señor Doctor D. Francisco Tomás Lorente, en el que concurren el mérito y el merecimiento, y por si fuera poco al que profeso una gran y profunda amistad nacida durante los años de universidad, cultivada y madurada en el tiempo y con los encuentros ocasionales, muchas veces provocados, a lo largo de los años, en los que además fui adquiriendo admiración por los trabajos y éxitos del amigo, muchas veces conseguidos con esfuerzo suplementario por tener que superar inconvenientes de lejanía de los entonces centros de investigación, y de las oportunidades o facilidades que en otros lugares mas favorecidos, podían encontrarse, que en provincias adonde escasamente llegaban las ayudas a la incipiente investigación, e incluso hasta el apoyo moral y comprensión a quién como en el caso como el del Dr. Tomás dedicaba

su entusiasmo, al tiempo que creaba una importante familia, allá en su tierra natal, a la que había que atender.

El Doctor Tomás, nos ha deleitado con la exposición de su APORTACIÓN AL ESTUDIO DE LOS FLAVONOIDES, en un recorrido en el que ha tratado desde las generalidades del conocimiento y origen botánico de estas sustancias, pasando por las estructuras químicas y diferenciales de los grupos, la síntesis, la evolución y perfeccionamiento de los métodos analíticos que han permitido llegar al conocimiento que hoy tenemos de ellos, la aplicación de estos métodos, para dejarnos unas gotas selectas sobre la bioactividad y la farmacología.

Esto por si mismo sería motivo mas que suficiente para ensalzar la calidad del discurso y el conocimiento que el Dr. Tomás tiene de esta materia y de la importancia científica, industrial, farmacológica y sanitaria que entraña. Pero no se ha detenido ahí, en cada paso ha ido, con suavidad y firme convicción, desgranando puntos clave en los que él personalmente ha contribuido en muchas ocasiones y que han facilitado el camino para que otros investigadores puedan seguir sus pasos y puedan perfeccionar el conocimiento y descubrir otros flavonoides que tanta importancia tienen y tendrán en la naturaleza, la industria y para la salud de las personas.

Centrando nuestro objetivo en el interés del tema planteado, hemos de señalar que los flavonoides tienen amplia difusión en los vegetales con funciones ornamentales como las de los antocianósidos que dan los colores rojo, azul y violeta a las flores, frutos y hojas, influyendo en la polinización al atraer a los insectos; ejercen poder protector de la vida de las plantas filtrando la radiación UV y protegen a la planta con su poder antioxidante.

Este mismo grupo de antocianósidos comprende una serie de compuestos de interés farmacéutico por sus efectos sobre los capilares y venas con propiedades vasoprotectoras y venotónicas aumentando la resistencia y disminuyendo su permeabilidad y fragilidad. Por otra parte y dada su naturaleza y práctica atoxicidad se utilizan como pigmentos para colorear medicamentos y alimentos.

Junto con este grupo de los antocianósidos, las flavonas, flavonoles, flavononas y sus heterósidos son los de mayor interés farmacológico y terapéutico

por su acción vitamínica P, por los efectos vasodilatadores, por inhibir la acción de enzimas relacionadas con el funcionalismo vascular. También se ha estudiado la acción antiagregante plaquetaria y el poder antiinflamatorio y el poder antioxidante.

Estamos ante un complejo mundo de principios activos, de los que muchos de ellos tienen utilidad terapéutica y que gozan, en general, de la peculiaridad de ser prácticamente atóxicos. Este es el mundo en el que nuestro recipiendario ha estado sumido desde que al terminar la carrera de Farmacia y el doctorado en Bioquímica, emprendió la apasionante aventura de la investigación que alternó con otros trabajos.

Naturalmente los productos naturales que nos ofrecen las plantas han pasado por varias etapas de conocimiento, que van desde el empirismo a la perfección actual lograda por aplicación de métodos analíticos, pasando, en el caso de los de interés terapéutico, por la criba farmacológica, el ensayo clínico y el tratamiento galénico para poderse convertir en medicamentos disponibles para tratar a los enfermos necesitados de ellos.

Sin embargo la inteligencia humana ha ido imitando a la naturaleza y perfeccionando estos principios activos a fin de conseguir la producción industrial y abaratar su obtención mediante síntesis, de tal manera que se puede diseñar la estructura molecular que se considere más idónea para obtener aquellos que puedan ser los apropiados para las indicaciones terapéuticas que se pretenden.

En este campo es donde también nos encontramos con el Dr. Tomás como estudioso y desentrañador de la estructura de varios de estos compuestos y como sintetizador o creador de moléculas previamente diseñadas para conseguir el fin previsto.

Repasando someramente la actividad industrial del Dr. Tomás, hallamos que es autor de más de 150 síntesis de productos industriales y farmacéuticos, tales como 10 sulfamidas; la síntesis de la nerolina y la bromelina permitió que la importante industria de perfumería para la que trabajaba, se convirtiera en el máximo proveedor europeo de estas sustancias, así como la síntesis del acetato de terpenilo, muy utilizado en perfumería, permitió a la empresa situarse a la cabeza mundial de los exportadores de este producto.

Hemos ido esbozando conocimientos y actividades y circunstancias que han permitido acercarnos al conocimiento de la persona que es el Dr. Tomás. Pero un conocimiento mas detallado y profundo le revela en el aspecto científico como un gran y apasionado investigador capaz de superar los muchos inconvenientes que ha encontrado en su camino, e incluso superar las tentaciones que ha tenido de dedicarse a actividades mas sencillas y lucrativas; y en el aspecto humano nos hallamos ante un hombre que fiel a su vocación armonizó y armoniza el trabajo, la familia, el ocio y la amistad.

Aún recuerdo la circunstancia que posiblemente fue el principio de la admiración que profeso al querido amigo. Realizábamos, un grupo amplio de compañeros de promoción, un viaje de visitas a empresas nacionales y europeas de farmacia, acompañados por nuestro profesor y maestro Dr. Santos Ruiz, cuando al llegar a Heidelberg me dijo que pensaba quedarse allí para hacer un curso de perfeccionamiento del alemán. Eran tiempos en los que no eran muy frecuentes las salidas y las estancias en el extranjero, por eso me causó un cierto sentimiento de extrañeza a la par que de sana envidia por lo que entonces se me antojaba como una afortunada osadía.

Aquel fue el principio. Después el profesor Santos Ruiz le ayudó a obtener una beca para realizar estudios predoctorales en la Universidad de Münster. En esta Universidad tuvo la oportunidad de conocer al Profesor Arne Tiselius de la Universidad de Upsala con ocasión de varias visitas que realizó a Münster. Tiselius había obtenido el premio Nóbel por su descubrimiento de la electroforesis y alentó y aconsejó a nuestro recipiendario, lo que unido a las sabias enseñanzas del profesor Micheel de la Universidad de Münster despertaron su vocación investigadora que tuvo, en España, el apoyo de los profesores Albareda, Botella Llusía, Lora Tamayo, González González, y por supuesto de nuestro maestro el profesor Santos Ruiz.

La continuación de este magnífico principio se resume, no sin dificultad, en:

- Ser el creador de una línea de investigación científica en el CEBAS de Murcia, del CSIC que tiene gran predicamento nacional e internacional.
- 145 publicaciones, la mayor parte en revistas prestigiosas extranjeras.

- Dirección de 11 tesis doctorales que alcanzaron, todas ellas, la máxima calificación. Los autores de estas tesis son actualmente:
 - Dos catedráticos de Universidad
 - Dos profesores de Investigación del CSIC
 - Dos investigadores del CSIC
 - Un Científico Titular del CSIC
 - Un Director General Científico de industria de alimentación
 - Dos Catedráticos de Enseñanza Media
 - Un Científico Titular de la Delegación de Sanidad en Murcia.
- Cinco monografías y colaboración en libros científicos
- Diez proyectos de investigación como investigador principal y colaboración en otros ocho
- Presidente del Comité Organizador del Primer Simposio de la Phytochemical Society of Europa
- Participe y directivo en numerosos congresos científicos
- Pertenece al Grupo de Investigación sobre Flavonoides y Polifenoles
- Como resumen de la actividad investigadora:
 - 58 Proyectos y contratos
 - 19 Tesis doctorales dirigidas
 - 5 Patentes
 - 255 Trabajos publicados

Como consecuencia práctica de estas actividades, ya citamos la fabricación y exportación de nerolina, bromelina y acetato de terpenilo. Hay que subrayar que la publicación del trabajo sobre obtención de hesperidina, publicado en 1970, permitió la creación de tres empresas para fabricarla. Hoy una de esas empresas está integrada en una importante multinacional.

Si nos preguntásemos si se puede conocer a una persona por sus hechos, la contestación está en los evangelios. Pero por lo que llevamos dicho quizás podamos conocer la faceta científica y de investigación del Dr. Tomás que es a lo que fundamentalmente nos hemos referido hasta ahora; pero existen otros hechos, otras actitudes, otros matices que configuran la faceta humana, sin la cual no podemos decir que conocemos la persona.

Hay algo que aparentemente es poco frecuente en personas como la que nos ocupa, que desde muy joven sintió la atracción por la investigación y que hace configurarle como un individuo metido en los libros y en sus reflexiones. Nada mas lejos de la realidad. Francisco Tomás era un joven deportista, buen velocista; tenía tiempo para el estudio y para el entrenamiento atlético, le gustaba el campo y el ejercicio al aire libre, afición no perdida que sigue cultivando aunque ya de otra manera como la pesca y la navegación. En los tiempos en que compartíamos pupitre en la Facultad de Farmacia de Madrid, parece como si hubiéramos acordado el desmentir aquello que se decía: que la asignatura de Educación Física, una de las tres “marías”, era el martirio de los empollones por que las mejores notas se las daban a los mas brutos. No era cierto, recuerdo como exhibíamos con orgullo la papeleta de calificación de matrícula de honor en gimnasia al propio tiempo que modestamente, él mas que yo, por que obtenía mejores calificaciones, ocultábamos las notas importantes en las asignaturas claves.

Ya hemos referido la capacidad de armonizar el trabajo, el ocio y la vida familiar, que tiene el Dr. Tomás. Esta armonía es la que preside su obra y actividad, apenas si se nota, es como ocurre en poesía que con palabras muy sencillas se pueden componer frases y pensamientos muy bellos, como el acompasamiento de la vida a que se refería Fray Luis de León, “ni envidiado ni envidioso”; pero no a solas, por que por fortuna también supo, como expresaba otro poeta, Gabriel y Galán, aprender en el hogar “en que se funda la dicha mas perfecta”, y encontrar la mujer, entre las hijas de su hidalga tierra, que complementara con la sabiduría que solo las mujeres, las grandes mujeres tienen, esa impalpable habilidad y maestría para formar y aglutinar la importante y feliz familia, que componen Francisco y Ana María con sus seis hijos: Francisco Abraham, Mabel, Manuel David, Santiago Daniel, Ulrika y Luis Benjamín.

Estamos, por desgracia, viviendo una época de crisis familiar, de alteración de valores, de culpabilidades achacadas siempre a otros, para derivar la propia, haciendo prevalecer o enmascarando el individualismo y el egoísmo. No es este el camino para un buen futuro, ni el caso del Dr. Tomás. Una anécdota ocurrida no hace mucho tiempo pone de manifiesto hasta que punto una persona, un hombre como Francisco Tomás asume y afronta la desgracia, y acepta personalmente los sinsabores evitando, en este caso, que Ana María, su esposa, sufriera o se preocupara ante una contingencia nefasta, que afortunadamente no tuvo, para ellos, consecuencias irreparables.

En la primavera del pasado año, un grupo de compañeros realizamos una pequeña escapada turística por el norte de España, fué cuando ocurrió el accidente ferroviario de Chinchilla. Al enterarnos, naturalmente sentimos la consternación propia del caso. Francisco Tomás comenzó a estar nervioso, cambió de actitud, estaba muy reservado y apenas participaba en los temas y conversaciones, y se la veía frecuentemente agarrado al teléfono. Procuré acercarme a él para si podía ayudar en algo hasta que se sinceró diciendo que el tren del accidente era el que su hijo cogía con frecuencia en sus desplazamientos a Madrid, pero no quería que se dijera nada para no preocupar a Ana María. Mas tarde consiguió averiguar que en efecto, su hijo figuraba entre la lista de hospitalizados, en observación, pero seguramente no era grave ya que incluso había colaborado en el salvamento de viajeros, en los primeros momentos del accidente. Ya con mayor tranquilidad decidió continuar el viaje, que duraría dos días más, sin decir nada a su esposa y pudiera disfrutar de unas pequeñas vacaciones bien merecidas. Solamente al regreso a Madrid, Ana María supo del accidente de su hijo, pero ya dado de alta, aunque con innumerables magulladuras.

Que sencillo de decir y que difícil de hacer. Solo quién tiene esa capacidad de sacrificio y respeto a los demás es merecedor de poder compartir la dicha que la familia proporciona.

Este es el Sr. Dr. D. Francisco Tomás Lorente del que me congratulo de pertenecer a su círculo de amigos y de haber tenido la ocasión de proponer para ingreso en esta Real Academia de Doctores de España. Los méritos que le acreditan ya fueron evaluados por la Comisión de Admisiones y revalidados con la votación del Pleno de la Academia.

Hoy he esbozado una breve semblanza que ha querido ser comprensiva de la oportunidad del tema elegido para el discurso, del interés que actualmente y para el futuro tiene, así como de algunos rasgos de su personalidad que definen una envidiable forma de ser y de trabajar.

Con ello, Excmo. Sr. Presidente, Excmos. e Ilmos. Sres. Académicos, Señoras y Señores, vuelvo a expresar el agradecimiento por haberseme designado para el grato menester de contestar al discurso de ingreso como Académico Numerario de la Real Academia de Doctores de España, del Exmo. Sr. Dr. D. Francisco Tomás Lorente.

Finalmente al repetir el alto honor que representa esta designación, no deseo olvidar de expresar la satisfacción íntima que el hecho me produce y decir también que el ingreso que celebramos debe constituir además un motivo y sentimiento de orgullo para todos y cada uno de nosotros al poder contar desde hoy con un compañero académico con los méritos y características que adornan al Sr. Dr. D. Francisco Tomás Lorente.

En nombre de la Corporación, bienvenido

He dicho.

Muchas gracias

BIBLIOGRAFIA DE FLAVONOIDES

- 1.- Amarowicz, R. And Shahidi, F. 1995. Antioxidant activity of green tea catechins in a b-carotene-linoleate model system. *J. Food Lip.* 2: 47-56.
- 2.- Arts, I.C.W., van de Putte, B. and Hollman, P.C.H. 2000^a. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agric. Food Chem.* 48(5): 1746-1751.
- 3.- Arts, I.C.W., van de Putte, B. and Hollman, P.C.H. 2000^b. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J. Agric. Food Chem.* 48(5): 1752-1757.
- 4.- Balentine, D.A. 1997. Introduction: tea and health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37(8): 691-692.
- 5.- Benko, S.; Gabor, M.; Varkonyi, T.; Antal, A.; Foldi, M. 1970. Brain edema and subpleural hemorrhage in experimental p-avitaminosis. *Physiol. Chem. Phys.*, 2, 110.
- 6.- Bentsath, A., Rusznyák, Szent-Györgi, A. 1936. Vitamin Nature of Flavones. *Nature (London)* 138: 798-798.
- 7.- Benzie, I.F.F., Szeto, Y.T., Strain, J.J. and Tomlinson, B. 1999. Consumption of green tea causes rapid increase in plasma antioxidant power in humans. *Nutr. Canc.* 35(1): 83-87.
- 8.- Beutsath, A., Szent-Györgi, A. 1937. Vitamin P. *Nature (London)*. 140: 426-426.
- 9.- Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C. and Rice-Evans, C.A. 1998. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* 330: 1173-1178.
- 10.- Bruchner, V., Szent-Györgi, A. 1936. Chemical Nature of Citrus. *Nature (London)* 138: 1057-1057.
- 11.- Cadenas, E. and Packer, L. 1996. *Handbook of Antioxidants*. Marcel Dekker Inc., New York. Cassidy, A., Hanley, B. and Lamuela-Raventos, R.M. 2000. Review: isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1044-1062.
- 12.- Cetta, G.; Gerzeli, G.; Quartieri, A.; Castellani, A.A. 1971. Protective effect of flavonoids on the collagen og lathyritic rats. *Experientia*, 27, 1046-1048.

- 13.- Chen, C.W. and Ho, C.T. 1995. Antioxidant properties of polyphenols extracted from green tea and black teas. *J. Food Lip.* 2: 35-46.
- 14.- Chen, C., Tang, H.R., Sutcliffe, L.H. and Belton, P.S. 2000. Green tea polyphenols react with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radicals in the bilayer of liposomes: direct evidence from electron spin resonance studies. *J. Agric. Food Chem.* 48(11): 5710-5714.
- 15.- Chiang, M.T.; Silva, M. 1978. Anticancer agents from *Pucea chingoyo* D.C. *Rev. Latinoamer. quim.*, 9, 102-104.
- 16.- Clifford, A.H. and Cuppett, S.L. 1997. Structure-activities of natural antioxidants. In: Clifford, M.N. 2000. Review: anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci Food Agric.* 80: 1063-1072.
- 17.- Conney, A.H., Wang, Z.Y., Huang, M.T., Ho, C.T. and Yang, C.S. 1992. Inhibitory effect of green tea on tumorigenesis by chemicals and ultraviolet light. *Prev. Med.* 21: 361-369.
- 18.- Day, A.J., DuPont, M.S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M.J.C., Morgan, M.R.A. and Williamson, G. 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *Febs. Lett.* 436: 71-75.
- 19.- Emiko, S.; Kurata, T.; Arakawa, H.; Inagaki, C. 1981. Investigation on vitamin C sparing effect of flavonoids. *Vitamins*, 55, 589-594.
- 20.- Etievant, P., Schlich, P., Bertrand, A., Symonds, P. and Bouvier, J.C. 1988. Varietal and geographic classification of French red wines in terms of pigments and flavonoid compounds. *J. Sci. Food Agric.* 42(1): 39-54.
- 21.- Fewtrell, C.M.S.; Gomperts, B.D. 1977. Effect of flavone inhibitors of transport ATPase rat mast cells. *Nature*, 265, 635-636.
- 22.- Frankel, S., Robinson, G.E. and Berenbaum, M.R. 1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *J. Apic. Res.* 37(1): 27-31.
- 23.- Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Piaggese LI, Genazzani AR. 1997. Effects of combined low dose of the isoflavone derivative ipriflavone and estrogen replacement on bone mineral density and metabolism in postmenopausal women. *Maturitas.* 28(1): 75-81.
- 24.- Gazabe, J.M.y Parrot, 1977. Acide L-ascorbique et collagène. *Plant. Med. Phytother.* 11 164.
- 25.- Gensler, H.L., Timmermann, B.N., Valcic, S., Wachter, G.A., Dorr, R., Dvorakova, K. and Alberts, D.S. 1996. Prevention of photocarcinogenesis by topical administration of pure epigallocatechin gallate isolated from green tea. *Nutr. Canc.* 26(3): 325-335.
- 26.- Giovanucci E, Egan KM, Hunter DJ, et al. 1995. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *En Engi J Med.* 333: 609-14.

- 27.- Harborne, J.B. 1967. *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. Academic Press, London.
- 28.- Harborne, J.B. Mabry, T.J. and Mabry, H. 1975. *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London.
- 29.- Harborne, J.B. 1982. Evolving flavonoid patterns in higher plants. In: Farkas, L., Gabor, M., Kallaly, F. and Wagner, H. (Ed). *Flavonoids and Bioflavonoids*. Elsevier Scientific Pub. Co., New York. Pp251-298.
- 30.- Harborne, J.B. and Mabry, T.J. 1982. *The Flavonoids: Advances in Research*. Chapman and Hall, London.
- 31.- Harborne, J.B. and Turner, B.L. 1984. *Plant Chemosystematics*. Academic Press, London.
- 32.- Harborne, J.B. 1998. *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*. Chapman and Hall, London.
- 33.- Isyeyev, M.K. 1970. The effects of vitamin P on capillary permeability and its blood levels in late toxicosis of pregnancy. *Pediat. Akush. Hinekol*, 32, 41.
- 34.- Jovanovic, S.V., Hara, Y., Steenken, S. and Simic, M.G. 1995. Antioxidant potential of gallo catechins. A pulse radiolysis and laser photolysis study. *J. Am. Chem. Soc.* 117(39): 9881-9888.
- 35.- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Simic, M.G. and Hara, Y. 1998. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoids radicals. *Flavonoids Health Disease*. 7: 137-161.
- 36.- Kazakov, A.L.; Luk'yanchikov, M.S.; Dzhumyrko, S.F.; Kompantsev, V.A. 1981. Flavonoids from several *Astragalus* spp. *Khim. Prir. Soedin*, O, 388-389.
- 37.- Keli, S.O., Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M. and Kromhout, D. 1996. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke. *Arch. Int. Med.* 156: 637-642.
- 38.- Khadzai, Y.I.; Obolentseva, G.N.; Litvinenko, U.I.; Marks Yutina, N.P. 1966. Relation between the flavonoid compounds. *Fiziol. Veshchestva, Akad. Nauk Ukr. SSR Respub. Nezhredom Sb*, 3, 9.
- 39.- Khan, S.G., Katiyar, S.K., Agarwal, R. and Mukhtar, H. 1992. Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. *Canc. Res.* 52: 4050-4052.
- 40.- Kubo, M.; Kimura, Y.; Odani, T.; Tani, T.; Namba, K. 1981. Studies on *Scutellariae radix*. The antibacterial substance. *Planta Med.*, 43, 194-201.
- 41.- Kupchan, S.M.; Sigel, C.W.; Knox, J.R. 1969. Tumor inhibitors. XXXVI. Eupatin and

- eupatoretin, two cytotoxic flavonols from *Eupatorium semiserratum*. *J. Org. Chem.*, 34, 1460-1463.
- 42.- Kupchan, S.M.; Bavershmidt, E. 1971. Cytotoxic flavonols from *Baccharis sarothroides*. *Phytochemistry*, 10, 664-666.
- 43.- Li, B.Q., Fu, T., Yan, Y.D., Mikovits, J.A., Ruscetti, F.W. and Wang, J.M. 2000. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 276(2): 534-538.
- 44.- Lin, J.K., Chen, P.C., Liang, Y.C., Ho, C.T. and Lin-Shiau, S.Y. 2000. Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2736-2743.
- 45.- Lou, F.Q., Zhang, M.F., Zhang, X.G., Liu, J.M. and Yuan, W.L. 1992. A study on tea pigment in the prevention of atherosclerosis. *Prev. Med.* 21: 333.
- 46.- Mabry, T.J.; Ulubelen, A. 1980. Chemistry and utilization of phenyl propanoids including flavonols, coumarins and ligans. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 188-196.
- 47.- Markham, K.R. 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London.
- 48.- Mayo J.L. 1998. The remarkable health benefits of soy isoflavone. *Clinical Nutrition Insights*. 6(139): 1- 4.
- 49.- Middleton, E. and Kandaswami, C. 1992. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem. Pharmacol.* 43(6): 1167-1179.
- 50.- Milstein y Kohler, 1984. Premio Nobel de Biología.
- 51.- Mirisalikova, N.M.; Pakudina, Z.P. 1977. Flavonoids as inhibitors of (Na⁺, K⁺ ion)-dependent ATP ase. *Khim. Prir. Soedin*, 1, 44.
- 52.- Mitscher, L.A.; RAO, G.S.R.; Khanna, I.; Veysoglu, T.; Drake, S. 1983. Antimicrobial agents from higher plants prenylated flavonoids and other phenols from *Glycyrrhiza lepidota*. *Phytochemistry*, 22, 573-576.
- 53.- Miyazawa, T. 1999. Tea catechin supplementation increases antioxidant capacity and prevents phospholipid hydroperoxidation in plasma of humans. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3967-3973.
- 54.- Myasnikov, L.A.; Kasatrina, L.U. 1970. The interrelation of metabolic indices of mucopolysaccharides and lipids in atherosclerosis. *Kardiologiya*, 10, 5.
- 55.- Odebiyi, O.O. 1982. Isolation of a new flavone and some essential oils with antimicrobial and antifungal properties from the stem bark of *Jatropha podagrica*. *Planta Med.*, 45, 138.

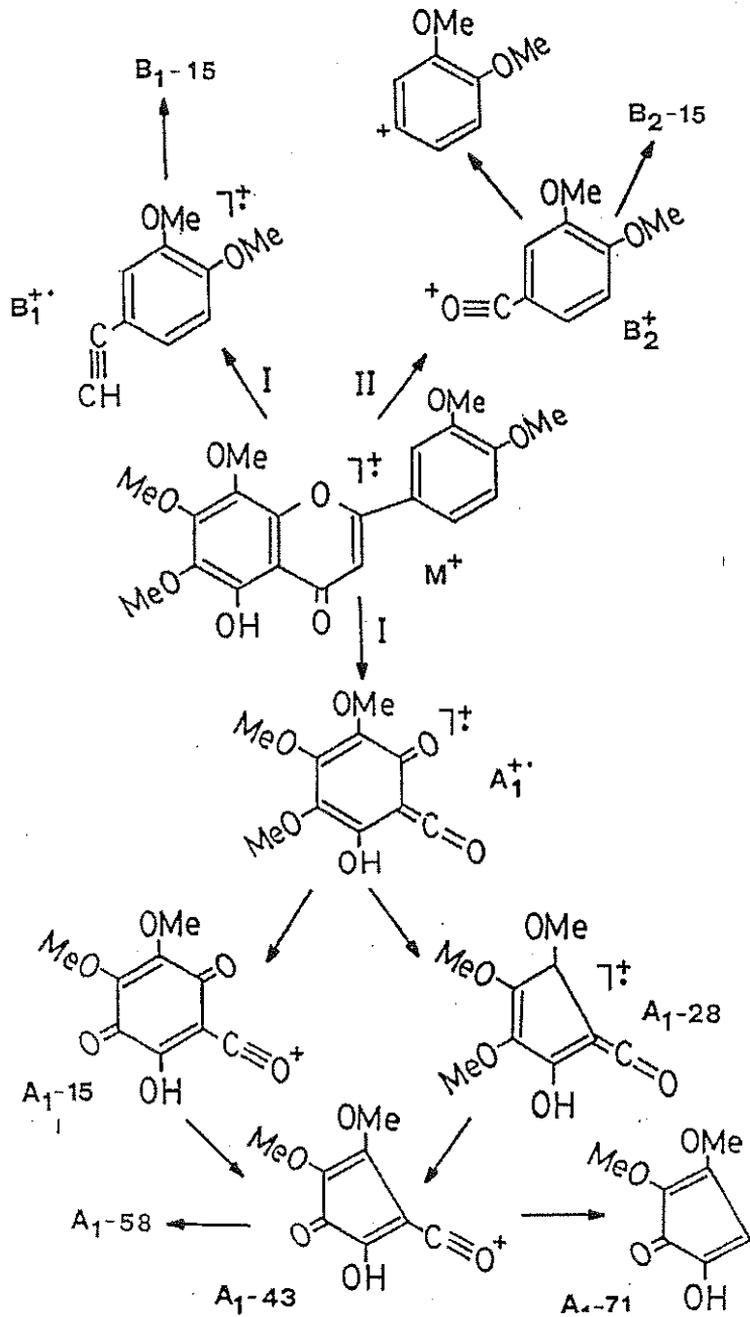
- 56.- Pan, M.H., Liang, Y.C., Lin-Shiau, S.Y., Zhu, N.Q., Ho, C.T. and Lin, J.K. 2000. Induction of apoptosis by the oolong tea polyphenol theasinensin through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in human U937 cells. *J. Agric. Food Chem.* 48(12): 6337-6346.
- 57.- Paquay, J.B.g., Haenen, G.R.M.M., Stender, G., Wiseman, S.A., Tijburg, L.B.M. and Bast, A. 2000. Protection against nitric oxide toxicity by tea. *J. Agric. Food Chem.* 48(11): 5768-5772.
- 58.- Ramaswamy, A.S.; Jayaraman,S.; Sirsi,M.; Rao, K.H. 1972. Antibacterial action of some naturally occurring Citrus bioflavonoids. *Indian J. Exp. Biol.*, 10, 72.
- 59.- Rao,C.N.; Rao, U.H.; Steinmann,B. 1981. Influence the bioflavonoids on the metabolisms and crosslinking of collagen. *Ital.J. Biochem.*, 30, 259-270.
- 60.- Robbins,R.C. 1973. Effect of methoxylated flavones on erythrocyte aggregation and sedimentation in blood of normal subjects: evidence of dietary role for flavonoids. *Int. J. Vitam.Nutr. Res.*, 43, 494-503.
- 61.- Ronziere,M.C.; Herbage,D.; Garrone,R.; Frey,J. 1981. Influence of some flavonoids on reticulation of collagen fibrils in vitro. *Biochemical Pharmacol*,30, 1771.
- 62.- Rusznyak St.Szent.György.A.1936.Vitamin P: Flavonols as vitamins.Nature (London) 138:27-27.
- 63.- Sano, M., Suzuki, M., Miyase, T., Yoshino, K. and Maeda-Yamamoto, M. 1999. Novel antiallergic catechin derivatives isolated from oolong tea. *J. Agric. Food Chem.* 47(5): 1906-1910.
- 64.- Sawa, T., Nakao, M., Akaike, T., Ono, K. and Maeda, H. 1999. Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 47: 397-402.
- 65.- Steinmetz, K.A.,Potter,J.D.,1996.Vegetables, fruit and cancer prevention: A review.
- 66.- Stenlid,G. 1976. Effects of substituents in the A-ring on the physiological activity of flavones. *Phytochemistry*, 15, 911-912.
- 67.- Swain, T. 1962. Economic importance of flavonoid compounds: foodstuffs. In: Geisman, T. A. (Ed). *The Chemistry of Flavonoid Compounds*. Pergamon Press, California. pp513-552.
- 68.- Szabo,R.; Antal,A.; Rednik,A.; Liptak,K.; Györi,I.; Gabor,M.; Benko,S. 1970. Effect of flavone-free-diet and of atherogenous treatment on lipid content and intimal structure of rat aorta. *Acta Med. Acad. Sc. Hung.*, 27, 297-306.
- 69.- Szent-György,A.1938. Methoden zur Herstellung von Citriu.Hoppe-Seyler's.Z. *Physiol.Chem.* 225:126-131.

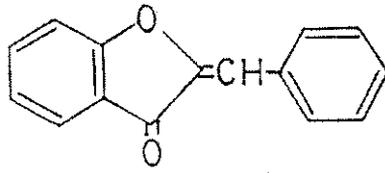
- 70.- Szent Györgi, A. 1955. Perspectives for the bioflavonoids. *Ann NY Acad. Sci* 61:732-735.
- 71.- Szent- Györgi, A. 1957. Personal communication.
- 72.- Tijburg, L.B.M., Mattern, T., Folts, J.D., Weisgerber, U.M. and Katan, M.B. 1997. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37(8): 771-785.
- 73.- Tomás Barberán, F.A. and Clifford, M.N. 2000. Review: flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80:1073-1080.
- 74.- Tomás Barberán, F.A. y Tomás Lorente, F. 1986. Espectrometría de masas de agliconas de flavonas, 3 metoxi flavonas y flavonoles. I. Ion molecular y derivados por pérdida de radicales. *ATA. V* 26 n°1: 35-52.
- 75.- Tomás Barberán, F.A., Tomás Lorente, F., Hernandez, L y Ferreres, F. 1985. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of 5-hydroxyflavone bearing tri- or tetra-substituted A rings. *Journal of Chromatography V.347:* 443-446.
- 76.- Tomás Barberán, F.A., Blazquez, M.A., García Viguera, C., Ferreres, F., Tomás Lorente, F. 1992. A comparative study of different Amberlite XAD resins in flavonoid analysis. *Phytochemistry Anal.* 3:178-181.
- 77.- Tomás Barberán, F.A., Ferreres, F., Blazquez, M.A., García Viguera, C., Tomás Lorente, F. 1993. High-performance liquid chromatography of honey flavonoids. *J. Chromatography, 634:* 41-46.
- 78.- Tomás Lorente, F y Santos Ruiz, A., 1956. Separación papirocromatográfica de fracciones estrogénicas. *Ac. Soc. Esp. Cien. y Fisiol.*, 89-91.
- 79.- Tomás Lorente, F. y Carpena, O. 1965. Identificación de flavonoides puros por cromatografía sobre papel. *Anal. Bromotol. V. XIII:* 305-312.
- 80.- Tomás Lorente, F., J. Mataix y Carpena, O. 1970. Métodos cromatográficos para la identificación de flavonoides en capa fina. *ATA. V. X:* 268-273.
- 81.- Tomás Lorente, F. y Carpena, O. Y Mataix, J. 1972. Análisis estructural de flavonoides en U.V.I. Reactivos formadores de complejos metálicos. *A. R. S. E. Fisic. Y Quím. V:* 68: 115-121.
- 82.- Tomás Lorente, F., Carpena, O. Y Mataix, J. 1972. Análisis estructural de flavonoides en U.V.II: Reactivos alcalinos. *A. R. S. E. Fisic. y Quím. V. 68,* 122-129.
- 83.- Tomás Lorente, F., Gómez, P., Mataix, J. y Carpena, O. 1972. Separación de flavonoides con sephadex. *ATA. V. XII,* 106-110.
- 84.- Tomás Lorente, F., Mataix, J. y Carpena, O. 1973. Algunos aspectos de la espectrofotometría IR de los flavonoides. *A. R. S. E. Fisic. y Quím. V. 69:* 1325-1328.
- 85.- Tomás Lorente, F., Pastor, R y Carpena, O. 1973. Separación de citroflavonoides por sephadex. *ATA. V. XIII:* 554-558.

- 86.- Tomás Lorente,F., Mataix,J. y Carpena,O.1973.Índice de desplazamiento típico de los flavonoides en UV. A.R.S.E. Fisic. Y Quím.V:69:357-344.
- 87.- Tomás Lorente,F., Ferreras,F. y Carpena,O.1976.Contribución al estudio estructural del anillo B de los flavonoides por espectrofotometría UV de sus complejos con Ni en medio alcalino. A.R.S. Esp. De Química. V.72 nº 9-10,800-803.
- 88.- Tomás Lorente,F., Pastor,R y Carpena,O. Comportamiento espectral de las flavonas en relación con sus estructuras. A.R.S.E. Fisic. y Quím. V 72: 801-813.
- 89.- Tomás Lorente,F. y Ferreres,F. 1977.Estudio en la molécula de los flavonoides de los hidroxilos libres en 3 y 5, por medio de los complejos de Ni(II). A.R.S.E. Fisic. y Quím. V 73: 363-868.
- 90.- Tomás Lorente,F. 1979. Leucantina, nuevo flavonas de la *Sideritis leucantina*.ATA.V: 9:224-228.
- 91.- Tomás Lorente,F., Tomás,M-D y Tomás,F.A.1982. Determinación estructural de oligosacáridos de flavonoides por espectrometría de masa de sus derivados PM y PDM. ATA.V.m22:465-479.
- 92.- Tomás Lorente,F.,Ferreres,F., Tomás Barberán,F.A.1983. 8-C-glicosilnaringenina en flores de *Acacia retinoide*. ARSE. Fisic. y Quím.Serie C: V79: 456-457.
- 93.- Tomás Lorente,F. y Tomás Barberán,F.A. 1986. Espectrometría de masas de agliconas de flavononas, 3 metoxiflavonas y flavonoles II. Iones producidos por fragmentación retro-Diel-Alder. ATA V26, nº2: 202-212.
- 94.- Tomás Lorente,F., Tomás Barberán,F.A., Marín,F y Guzmán,G.1986. Los flavonoides como marcadores químicos del origen vegetal del polen agrícola. ATA.V 26, nº3:451-454.
- 95.- Tomás Lorente, F., y Ferreres,F.1988. Sulfatos de flavonoides en frutos de *Phoenix dactilifera*. ATA.V,nº4: 581-585.
- 96.- Tomás Lorente,F., Iniesta San Martín, E., Tomás Barberán,F.A., Trowitzseh,W and Wray.1989. Antifungal phloroglucinol derivatives and lipophilic flavonoids from *Helichrisum decubens*. *Phytochemistry*,V.28 nº6.1613,1615.
- 97.- Unno, T., Sugimoto, A. and Kakuda, T. 2000. Scavenging effect of tea catechins and their epimers on superoxide anion radicals generated by a hypoxanthine and xanthine oxidase system. *J. Sci. Food Agric.* 80: 601-606.
- 98.- Villanueva,V.R.; Barbier,M.; Gonnet,M.; Lavie,P. 1970. Les flavonoides de la propolis isolement d'une nouvelle substance bacteriostatique: la pinocembrine (dihidroxy-5,7 flavanone). *Ann. In Past.*, 118, 84-87.
- 99.- Villar,A.; Espluges,J.; Alcaraz,M.J. 1982. Acute antiinflammatory activity of *Sideritis mugronensis* flavonoid. *Arch. De Farmacol. y Toxicol.*, VIII, 99-106.

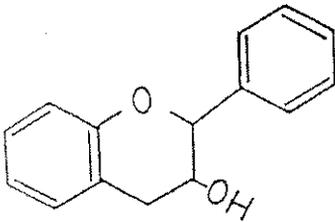
- 100.- Villar,A.; Rios,J.L.; Zafra-Polo,M.C.; Mares,M. 1983. Activité antimicrobienne de six espèces de Sideritis. 5 ème colloque consacré aux plantes médicinales. Angers.
- 101.- Wang, Z.Y., Huang, M.T., Ho, C.T., Chang, R., Ma, W. and Ferraro, T. 1992. Inhibitory effect of green tea on growth of established skin papillomas in mice. *Canc. Res.* 52: 6657-6665.
- 102.- Wattenberg,L.W.; Leong,J.L. 1970. Inhibition of the carcinogenic action of benzo (alfa) pyrene by flavones. *Cancer Res.*, 30, 1922-1925.
- 103.- Wollenbeyer, E. and Dietz, 1986. Occurrence and distribution of free flavonoid allylchalcone in plants. *Phytochem.* 20(5): 869-932.
- 104.- Yochum, L.A., Kushi, L.H., Meyer, K. and Folsom, A.R. 2000 a. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am. J. Epidemiol.* 149(10): 943-949.
- 105.- Zhu, Q.Y., Huang, Y., Tsang, D. and Chen, Z.Y. 1999. Regeneration of α -tocopherol in human low-density lipoprotein by green tea catechin. *J. Agric. Food Chem.* 47(5): 2020-2025.

FRAGMENTACION RDA

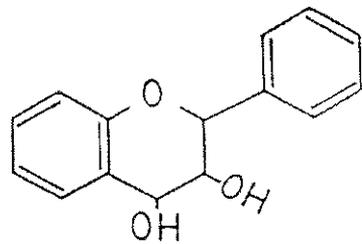




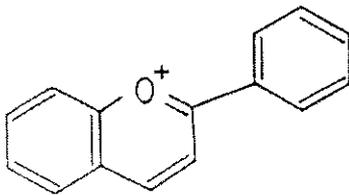
VII - AURONA



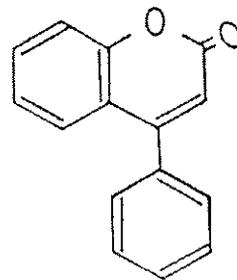
CATEQUINAS



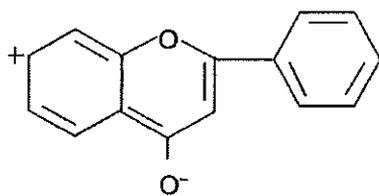
LEUCOANTOCIANOS



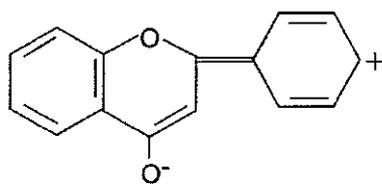
ANTOCIANOS



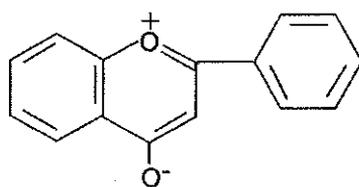
NEOFLAVONAS



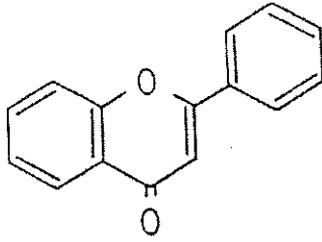
(I) benzoyl



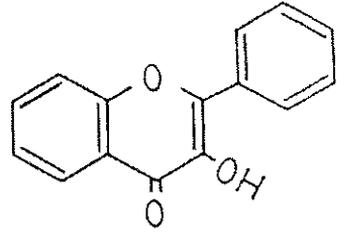
(II) cinnamoyl



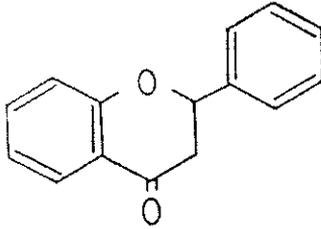
(III) pyrone



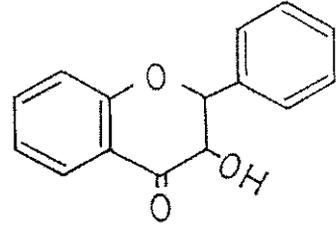
I-FLAVONA



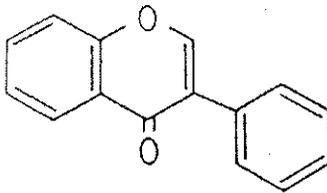
II-FLAVONOL



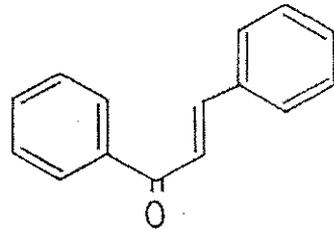
III-FLAVANONA



IV-DIHYDROFLAVONOL



V-ISOFLAVONA



VI-CHALCONA