

# RADICALES LIBRES, ANTIOXIDANTES NATURALES Y MECANISMOS DE PROTECCIÓN\*

MARCIA AVELLO\*\* Y MARIO SUWALSKY\*\*\*

## RESUMEN

En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático. Las reacciones químicas de los radicales libres se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo y son necesarias para la salud, pero el proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante. Entre los antioxidantes que se ingieren por la dieta destacan las vitaminas y los compuestos fenólicos que por diversos mecanismos neutralizan especies radicalarias. Estas especies pueden encontrarse en el plasma sanguíneo, el que puede estabilizar especies reactivas del oxígeno, previniendo reacciones que pueden generar especies aún más nocivas. Es de especial importancia su consumo moderado a través de la dieta y evitar los factores de riesgo que inducen reacciones oxidativas en nuestro organismo.

**Palabras claves:** Radicales libres, antioxidantes, polifenoles.

## ABSTRACT

Actual evidences affirm that free radicals and the oxygen reactive species involved play a central role in our homeostatic balance. The chemical reactions of free radicals take

\* Este trabajo contó con el apoyo de los proyectos de investigación FONDECYT 1060990 y DIUC 204.074.037-1.0.

\*\* Magister en Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Concepción. Profesora del Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. E-mail: maavello@udec.cl

\*\*\* Doctor en Ciencias, Instituto Weizmann, Israel. Profesor del Departamento de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. E-mail: msuwalsk@udec.cl

place constantly in the cells and they are necessary for human health, but the process must be controlled with an adequate antioxidant protection. Among the antioxidants that are ingested in the diet, vitamins and phenolic compounds are prominent because they neutralize the radical species through several mechanisms. These species that can be found in the plasma may stabilize reactive oxygen species, preventing reactions that can generate more deleterious molecules. Ingestion of antioxidants through the diet is of special importance, as well as to avoid risk factors that induce oxidative reactions in our bodies.

*Keywords:* Free radicals, antioxidants, polyphenols.

*Recibido:* 02.04.2006. *Aceptado:* 30.06.2006.

## INTRODUCCION

LOS RADICALES libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos; de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus.

Estas acciones se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo, proceso que debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante. Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre, los que son captados por los radicales libres. El problema para la salud se produce cuando nuestro organismo tiene que soportar un exceso de radicales libres durante años, producidos mayormente por contaminantes externos, que provienen principalmente de la contaminación atmosférica y el humo de cigarrillos, los que producen distintos tipos de radicales libres en nuestro organismo. El consumo de aceites vegetales hidrogenados tales como la margarina y el consumo de ácidos grasos trans como los de las grasas de la carne y de la leche también contribuyen al aumento de los radicales libres (Finkel y Holbrook, 2000).

## ESTRES OXIDATIVO

Especies reactivas del oxígeno (ERO) es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático, que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos. En mamíferos son muchos los procesos fisiopatológicos causados por estas especies tales como los mecanismos patogénicos asociados a virus, bacterias, parásitos y células anormales, constituyendo un mecanismo de defensa del organismo frente a estos agresores. Cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Gutteridge y Halliwell, 1999).

### ERO

El oxígeno es una molécula básicamente oxidante, hasta el punto que en las células que lo utilizan para su metabolismo es el principal responsable de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). Sin embargo, no todas las especies oxidantes tienen un origen endógeno; la existencia de factores exógenos, como la radiación solar, toxinas fúngicas, pesticidas o xenobióticos, pueden incrementar su nivel. En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno ( $O_2$ ) con la formación de agua sin formación de intermediarios tóxicos, mientras que un pequeño porcentaje (en torno al 5%) forman tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales son literalmente radicales libres (el anión superóxido y el hidroxilo). En situaciones en las que exista una mayor actividad metabólica (etapas del crecimiento, desarrollos activos o procesos inflamatorios) ocurre una mayor demanda tisular de  $O_2$  y parte de él se metaboliza, generándose un alto número de sustancias oxidantes.

La segunda gran fuente de ERO también es endógena y está constituida por el metabolismo de las células defensivas tales como los polimorfonu-

cleares, los monocitos sensibilizados, los macrófagos y los eosinófilos. Para que éstas puedan cumplir su misión, están dotadas de diversas proteínas así como de vías metabólicas que generan varias especies químicamente agresivas como peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo, cuyo fin último es lesionar y destruir elementos extraños. En condiciones normales estas especies reactivas son producidas y utilizadas en compartimentos celulares como los lisosomas que, aunque en el interior de los fagocitos, no tienen por qué dañar a las células siempre y cuando los mecanismos antioxidantes de éstas funcionen adecuadamente.

Los oxidantes pueden también proceder del exterior, bien sea directamente o como consecuencia del metabolismo de ciertas sustancias. Algunos ejemplos lo constituyen la contaminación ambiental, la luz solar, las radiaciones ionizantes, una concentración de oxígeno demasiado elevada, los pesticidas, metales pesados, la acción de ciertos xenobióticos (cloroformo, paracetamol, etanol, tetracloruro de carbono, violeta de genciana) o el humo de tabaco. Sin embargo el papel de los radicales libres no ha de ser abordado sólo desde una perspectiva negativa o patológica. Estos compuestos cumplen también una función fisiológica al participar, en condiciones normales, en la defensa frente a las infecciones, en el metabolismo normal, en la fagocitosis e inflamación.

## PEROXIDACION LIPIDICA

Todas las células están rodeadas por una membrana que las separa del medio extracelular. La membrana celular contiene proteínas que juegan papeles vitales en la interacción de la célula con otras células, hormonas y agentes reguladores del líquido extracelular. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva (Goodam, 1998). Éstas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y por lo tanto vulnerables al ataque de radicales libres que traen como consecuencia la peroxidación lipídica. Esta es generalmente inducida por un radical hidroxilo que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado, lo que genera una cadena de reacciones oxidativas. Los antioxidantes, pueden formar complejos estables impidiendo la acción catabólica de los radicales libres en la membrana celular (Halliwell, 1990).

Los mecanismos homeostáticos con que el organismo enfrenta el daño oxidativo que habitualmente causan estas especies son numerosos y diver-

sos, reflejando la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas, como también los numerosos compartimientos donde actúan en el organismo y las propiedades físicas de éstos (Kinsella *et al.*, 1993).

## SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE CELULAR

La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres (Thornalley y Vasak, 1985; Greenwald, 1990; Palamanda y Kehrer, 1992). Estos mecanismos son adecuados a la muy corta vida media de los radicales libres y comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas con capacidad antioxidante. Los antioxidantes exógenos provienen de la dieta, y dentro de este grupo se incluyen la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides. La vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre, mientras que la vitamina E es el antioxidante lipofílico mayoritario. El selenio, el más tóxico de los minerales incluidos en nuestra dieta, actúa junto con la vitamina E como antioxidante (Kinsella *et al.*, 1993). La vitamina E se encuentra presente en aceites vegetales, aceites de semilla, germen de trigo, maní, carnes, pollo, pescados y algunas verduras y frutas, en tanto la vitamina C se puede encontrar en frutas y verduras. Los carotenoides son compuestos coloreados tales como los betacarotenos, presentes en verduras y frutas amarillas y anaranjadas, y en verduras verdes oscuras, los alfacarotenos en la zanahoria, los licopenos en el tomate, las luteínas y xantinas en verduras de hojas verdes como el brócoli, y las beta criptoxantinas en frutas cítricas.

Recientemente se han descubierto en algunos alimentos otros antioxidantes no nutrientes, los compuestos fenólicos. Algunas fuentes son los frijoles (isoflavonas), cítricos (flavonoides), cebolla (quercetina) y polifenoles (aceitunas). También se han encontrado algunos antioxidantes fenólicos en el café, vino tinto y té. Por esta razón, la forma de suplir los antioxidantes para proteger al organismo del efecto oxidativo producido por los radicales libres es el consumo de alimentos ricos en vitamina E, vitamina C, carotenoides y otras sustancias que tienen función antioxidante, tales como los compuestos fenólicos (Tabla I).

TABLA I. Vitaminas con actividad antioxidante y sus fuentes alimentarias.

VITAMINA	FUENTE ALIMENTARIA
Vitamina E	<p><b>Fuentes más importantes</b> Aceites vegetales, aceites de semillas prensadas en frío, germen de trigo y de maíz, almendras, avellanas, girasol, frijol de soya, nuez, maní.</p> <p><b>Otras fuentes significativas</b> Papas frescas, pimentón, palta, apio, repollo, frutas, pollo, pescado.</p>
Vitamina C	<p><b>Frutas</b> Limón, lima, naranja, guayaba, mango, kiwi, fresa, papaya, mora, piña.</p> <p><b>Verduras</b> Tomate, verduras de hojas verdes (espinacas, perejil, hojas de rábano), repollo, coliflor, brócoli, pimentón, lechuga.</p>
Carotenoides	<p><b>Betacaroteno</b> Verduras y frutas amarillas y anaranjadas, verduras verde oscuro.</p> <p><b>Alfacaroteno</b> Zanahoria</p> <p><b>Licopeno</b> Tomate</p> <p><b>Luteína y zexantina</b> Verduras de hoja verde oscuro, brócoli</p>

## COMPUESTOS FENOLICOS

Se trata de un gran grupo de compuestos presentes en verduras y frutas, en los que ejercen una potente acción antioxidante necesaria para el funcionamiento de las células vegetales (Tabla II).

TABLA II. Productos alimenticios con alto contenido de antioxidantes fenólicos.

PRODUCTO	ANTIOXIDANTE
Frijol de soya	Isoflavonas, ácidos fenólicos
Té verde, té negro	Polifenoles, catequinas
Café	Esteres fenólicos
Vino tinto	Acidos fenólicos, polifenoles
Romero	Acido carnósico, ácido rosmárico
Cítricos y otras frutas	Bioflavonoides, chalconas
Cebollas	Quercetina, camferol
Aceitunas	Polifenoles

Un producto con contenido importante en polifenoles es el vino, componente esencial de la dieta mediterránea y que puede ser uno de los factores responsables de la baja incidencia de enfermedad coronaria en las poblaciones mediterráneas (Renaud & De Lorgeril, 1992; Renaud & Ruf, 1994). Varios estudios han analizado las posibles explicaciones de la así llamada “paradoja francesa” y el efecto de la dieta mediterránea (De Lorgeril & Salen, 1999; Renaud & Ruf, 1994), los que demostraron que la correlación entre la mortalidad coronaria y el consumo de diferentes alimentos, en un conjunto de 21 países, es mucho mayor en el vino que para otras fuentes, como verduras y grasas vegetales. Por otra parte, la correlación positiva para grasas derivadas de productos lácteos es alta, de modo que estos autores priorizan el papel del vino sobre el de frutas y verduras (Renaud & Ruf, 1994). La capacidad antioxidante del vino está directamente relacionada con su contenido en polifenoles. El tipo de polifenoles determina en último término su capacidad antioxidante y su concentración cambia según su variedad, área de producción, técnicas agrarias, proceso de vinificación, vendimia, año y edad.

La contribución de cada compuesto en particular depende no sólo de su concentración y de su calidad antioxidante sino que también de su interacción con otros componentes. Estudios *in vitro* demuestran el efecto protector del vino sobre la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo que podría explicar su efecto *in vivo*. La LDL es un transportador de colesterol que lo lleva desde el hígado hacia los tejidos, es el llamado *colesterol malo*. Los estudios indican que la ingestión de vino tinto está asociada a un aumento de la capacidad antioxidante del plasma, vale decir que en algún grado será necesario determinar qué componentes antioxidantes del vino son absorbidos en el tubo digestivo, alcanzando concentraciones plasmáticas suficientes para proteger a las LDL de la oxidación, ya que al oxidarse el organismo las encapsula, depositándose en las arterias, constituyendo la placa aterosclerótica. Los estudios de intervención a largo plazo demuestran que el consumo moderado y regular de vino eleva la capacidad antioxidante del plasma, la resistencia de las LDL a la oxidación y el contenido total de polifenoles plasmáticos. En otros estudios se ha observado que una dieta rica en grasas induce daño oxidativo en el ADN, mientras que una dieta rica en frutas y verduras lo protege. Claramente el consumo moderado y regular de vino tinto previene el daño oxidativo al ADN, inducido por una dieta rica en grasas, y confiere protección adicional una dieta rica en frutas y verduras. Estos resultados concuerdan con evidencias epidemiológicas que muestran el rol protector de frutas, verduras y vino en la reducción de ciertos tipos de cáncer. Se puede agregar, además, que el consumo moderado y regular de vino tinto protege la función endotelial. El endotelio es la capa celular arterial que está en directo contacto con la sangre. Cada vez hay más evidencias que asocian la disfunción endotelial con hipercolesterolemia,

hipertensión, tabaquismo, diabetes y otros factores de riesgo de enfermedad cardiovascular. Se ha postulado a la disfunción endotelial como el evento primordial en la cadena de fenómenos que lleva a la formación de placas degeneradas presentes en la aterosclerosis. La explicación causal probablemente está relacionada con el aporte de antioxidantes que hace el vino tinto, los que protegerían al óxido nítrico, principal regulador de la función endotelial y que es producido por las células endoteliales. Los antioxidantes del vino tinto, compuestos fenólicos, particularmente flavonoides, serían los responsables de la mantención de la actividad vascular, especialmente en los individuos que ingieren dieta grasa, la que induce estrés oxidativo.

## ANTIOXIDANTES PLASMATICOS

Existen evidencias epidemiológicas que sustentan el papel patogénico de los radicales libres en procesos biológicos (Maxwell, 1995). Los principales antecedentes surgen de estudios que muestran la correlación entre la incidencia de enfermedades inflamatorias y degenerativas y las bajas concentraciones de antioxidantes en la sangre (Sohal y Weindruch, 1996). La relación entre la presencia de algunas enfermedades, como las cardiovasculares y cáncer entre otras, se puede establecer con la elevación de marcadores de daño oxidativo y disminución de los niveles plasmáticos de antioxidantes, los que pueden ser modificados al aumentar la ingesta de antioxidantes (Meydani, 2001; Laurin *et al.*, 2004). El plasma puede estabilizar especies reactivas del oxígeno de vida media mayor, como el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno, previniendo reacciones con iones metálicos catalíticos que pueden generar especies aún más nocivas (Halliwell y Gutteridge, 1989). Debido a esto, el estatus antioxidante del plasma es el resultado concomitante de muchos compuestos e interacciones metabólicas sistémicas. La medición de esta capacidad antioxidante combinada puede ser más relevante que la determinación individual de los antioxidantes presentes en la sangre. A lo anterior se suma el hecho que la capacidad antioxidante celular está principalmente determinada por sistemas enzimáticos, mientras que las plasmáticas están asociadas a la concentración de antioxidantes de bajo peso molecular suplementados por la dieta. Estos compuestos son rápidamente consumidos y necesitan ser recambiados para mantener el balance frente a las especies oxidantes. Generalmente se investiga su efecto en el estatus antioxidante plasmático de voluntarios sanos sometidos a la ingestión de éstos.

Es posible concluir que la complejidad de los productos naturales con capacidad antioxidante constituye uno de los más grandes desafíos para los fitoquímicos, tanto en el aislamiento y elucidación estructural de principios



activos como en el estudio de éstos en medios biológicos. En nuestros laboratorios hemos estado estudiando la capacidad antioxidante de una planta chilena, la *Ugni molinae* Turcz, conocida como Murtilla, cuyas hojas a la forma de infusiones eran originalmente utilizadas por pueblos nativos para tratar la diarrea y disentería (Hoffmann, 1991). Es un arbusto de gran follaje que crece en el sur del país, de hojas pecioladas aovado-oblongas con ápice agudo de 2-2,5 centímetros de longitud; sus frutos, consistentes en bayas rojizas de sabor dulce y aromático, son comestibles (ver figuras). Estudios sobre la composición química de las hojas señalan la presencia de polifenoles (Rubilar *et al.*, 2006), compuestos que se caracterizan por tener propiedades antioxidantes y bajas toxicidades (Devany, *et al.*, 1997). En efecto, nuestros trabajos experimentales demostraron que los extractos de sus hojas poseen dicha propiedad (Suwalsky *et al.*, 2006a). Cabe también destacar que los mecanismos moleculares de la acción antioxidante no están del todo aclarados y aún es materia de debate. Sin embargo, se ha sugerido que las moléculas con propiedades antioxidantes se ubicarían en las membranas que rodean las células afectando su fluidez, impidiéndose de este modo la difusión de los radicales libres al interior de las células (Arora *et al.*, 2000). Los resultados de nuestros estudios demostraron que, efectivamente, los extractos de las hojas de Murtilla perturbaban las estructuras de membranas celulares (Suwalsky *et al.*, 2006b). Estos resultados permiten concluir que dado a que las hojas de Murtilla contienen compuestos con capacidad antioxidante, podrían utilizarse con fines preventivos frente al estrés oxidativo.



FIGURA 1. Frutos de *Ugni molinae* (Murtilla).



FIGURA 2. *Ugni molinae* (Murtilla). Fotografía gentileza del Dr. Roberto Rodríguez Ríos.

## REFERENCIAS

- De Lorgeril, M. & Salen, P. 1999. "Wine ethanol, platelets, and mediterranean diet", in *Lancet*. 353, pp. 1.067.
- Finkel, T. & Holbrook, N.J. 2000. "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing", en *Nature*. 408, pp. 239-247.
- Goodman, S.T. 1998. *Medical cell biology*, vol. II, pp. 27-65, USA: Goodman, S.T., ed. Lippincott-Raven Publishers.
- Greenwald, R. 1990. "Current approaches to the development of oxygen radical scavengers", in *Drugs of Today*. 26, pp. 299-307.
- Gutteridge, J. & Halliwell, B. 1999. *Reactive oxygen species in biological systems*, pp. 189-218, New York, USA: D.L. Gilbert and C.A. Colton, eds.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 1989. *Free radicals in biology and medicine*, 2<sup>da</sup> edic., Oxford, London: Clarendon Press.
- Halliwell, B. 1990. "How to characterize a biological antioxidant", in *Free Radical Research Communication* 9, pp. 1-32.
- Kinsella, J.E.; Frankel, E.; German, B. & Kanner, J. 1993. "Possible mechanism for the protective role of antioxidants in wine and plants foods", in *Food Technology*, pp. 85-89.
- Laurin, D.; Masaki, K.-H.; Foley, D.J.; White, L.R. & Launer, L.J. 2004. "Midlife dietary intake of antioxidants and risk of late-life incident dementia: the Honolulu-Asia aging study", in *American Journal of Epidemiology* 159, pp. 959-967.
- Maxwell, S.R. 1995. "Prospects for the use of the use of antioxidant therapies", in *Drugs* 49, pp. 345-361.
- Meydani, M. 2001. "Nutrition interventions in aging and age-associated disease", in *Annals of the New York Academy of Sciences* 928, pp. 226-235.
- Palamada, J. & Kehrer, J. 1992. "Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes", in *Archives of Biochemistry and Biophysics* 293, pp. 103-109.
- Renaud, S. & De Lorgeril, M. 1992. "Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease", in *Lancet* 339, pp. 1523-1526.
- Renaud, S. & Ruf, J.C. 1994. "The french paradox: vegetables or wine", in *Circulation* 90, pp. 3119-3119.
- Rubilar, M.; Pinelo, M.; Ihl, M.; Scheuermann, E.; Sineiro, J. & Nuñez, M.J. 2006. "Murta leaves (*Ugni Molinae* Turcz) as a source of antioxidant phenols", in *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54, pp. 59-64.
- Sohal, R.S. & Weindruch, R. 1996. "Oxidative stress, caloric restriction and aging", in *Science* 273, pp. 59-63.
- Suwalsky, M.; Orellana P; Avello M.; Villena F. & Sotomayor, C.P. 2006a. "Human erythrocytes are affected in vitro by extracts of *Ugni molinae* leaves", in *J. Chem Food Toxicol* (en prensa).
- Suwalsky, M.; Orellana, P.; Avello, M. & Villena, F. 2006b. "The antioxidant capacity of *Ugni molinae* Turcz against in Vitro cytotoxicity of HClO in human erythrocytes" (manuscrito en preparación).

Thornalley, P.J., Vasak, M. 1985. "Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals", en *Biochimia et Biophysica Acta* 827, pp. 36-44.

