

Investigación: Área estomatología

Compuestos fenólicos, actividad antioxidante. Bases farmacológicas y su aplicación en medicina general y oral.

AUTORAS

Emilce M. RIVAROLA de GUTIERREZ

Médica. Jefe de trabajos prácticos del Módulo de Estomatología, Facultad de Odontología de la UNCuyo.

Amanda DI FABIO

Ingeniera. Profesora Titular de la Cátedra de Farmacobotánica de la Universidad A. Maza. Mendoza.

RESUMEN

Los flavonoides, compuestos fenólicos, son los pigmentos responsables de la coloración de las flores, frutos y hojas, presentes en las uvas y en otros frutos como las moras, frambuesas, arándanos entre otros. Tienen actividad antioxidante comprobada. El daño tisular oxidativo y la apoptosis, pueden ser atenuados por las antocianinas, un subgrupo de los flavonoides, en células aisladas cultivadas de tejidos orales humanos. En este trabajo se describen las bases farmacológicas para la aplicación de las mismas en el tratamiento de las patologías orales donde está comprobado el stress oxidativo como vía patogénica de las mismas.

Palabras clave: Flavonoides - antocianinas - enfermedades orales - antioxidantes - stress oxidativo.

ABSTRACT

Flavonoids are polyphenolic compounds and they are the responsible of the colour of dark grapes and of many other fruits as blueberries, strawberries, bilberries. They have antioxidant effects. Oxidative tissue damage and apoptosis can be attenuated by anthocyanins, a group of flavonoids, in isolated cells cultured from human oral tissues. In this report we describe the pharmacologic bases for the use of anthocyanins in those oral diseases where oxidative stress has been shown to have a pathogenic roll.

Key words: Flavonoids - anthocyanins - oral diseases - antioxidants - oxidative stress.

En diversas patologías de la mucosa oral, se ha demostrado la presencia del stress oxidativo implicado en sus procesos fisiopatogénicos. En la mayoría de estas entidades la etiología se desconoce, pero se incluye al proceso inflamatorio en la patogenia de todas ellas. Las patologías en las cuales ha sido demostrado el stress oxidativo son: liquen oral (1, 2, 3, 4), Síndrome de Sjögren (5) estomatodinia (6, 7, 8, 9), leucoplasia oral (10), periodontitis (11),

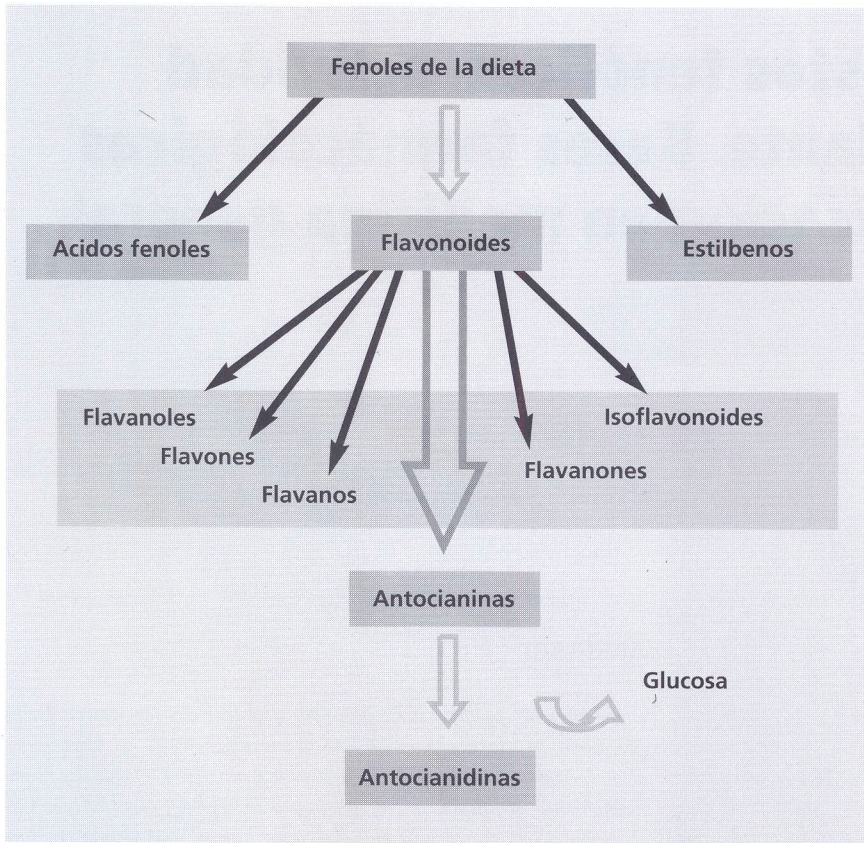
úlceras orales (12, 13, 14, 15, 16) y mucositis (17, 18, 19, 20).

El uso de antioxidantes aplicados localmente en la mucosa oral, como los flavonoides que *lato sensu* son pigmentos presentes en la uva, podría ser de utilidad para tratar estas afecciones orales inflamatorias. Los extractos de semillas de uva (ESU) y los extractos provenientes de los hollejos de las uvas (EHU) contienen estos

principios activos con actividad antioxidante, también presentes en otras frutas, vegetales, chocolate, té, etc. Se ha determinado que una persona consume en promedio 180-1000 mg /día de estas sustancias combinadas (21).

De todos los principios activos descu- biertos en la vid indudablemente los compuestos fenólicos (Figura 1) han despertado gran interés desde el punto de vista de la investigación farmacológica (22).

Area estomatología



color a lo largo del tiempo, encontrándose en gran medida relacionada con su composición en compuestos fenólicos presente en los granos de uvas con actividad antioxidante. Estos compuestos se clasifican en dos grandes subgrupos. (25)

■ **A. No flavonoides**, estos componentes presentan un anillo bencénico (C6-R), incluyen dos grandes familias: los ácidos fenoles y los estilbenos. La estructura básica de los compuestos fenólicos es la siguiente:

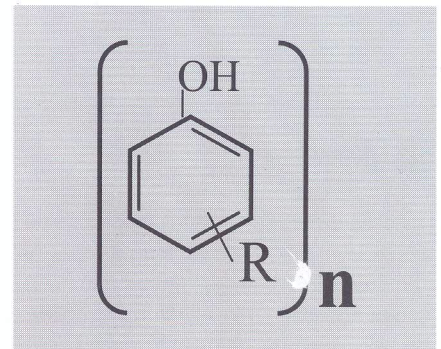


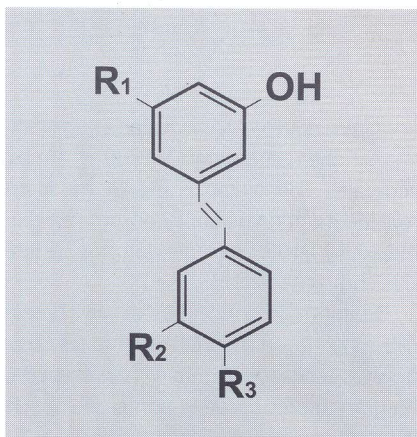
Figura 1: Fenoles adquiridos con la dieta

La uva (*Vitis vinifera*) es quizás la especie más utilizada por las antiguas civilizaciones que poblaron la Tierra (23). Hipócrates, Teofrasto, Dioscórides, Galeno y Plinio hicieron mención de sus propiedades medicinales.

Composición química. Antioxidantes presentes en *Vitis vinifera*

Se ha estudiado intensivamente la capacidad de los vinos tintos para mantener el

Los ácidos fenoles se encuentran en los hollejos, en la pulpa de la baya y en las semillas, y se subdividen en ácidos benzoicos y ácidos cinámicos. Ambos pueden estar en forma libre o bien esterificada con el ácido tartárico u otros componentes (26).

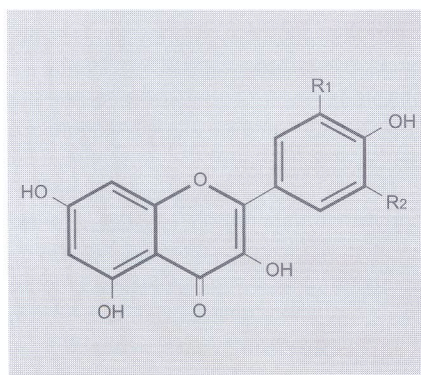


Estilbeno

Principales estilbenos	R1	R2	R3
Resveratrol	OH	H	OH
Piceida	OGlucosa	H	OH
Astringina	OGlucosa	OH	OH
Resveratrolósido	OH	H	OGlucosa
Picetanol	OH	OH	OH

Tabla 1: Principales estilbenos. (25)

Compuestos fenólicos, actividad antioxidante. Bases farmacológicas y su aplicación en medicina general y oral.



Estructura flavonoles

Los estilbenos se encuentran relacionados con mecanismo de defensa de los frutos contra los ataques fúngicos y se encuentran solamente en el hollejo. Los principales componentes son: resveratrol, piceida, astringina, resveratrolósido y pice-tanol. Han cobrado importancia debido a los efectos beneficiosos que el resveratrol y otros componentes fenólicos parecen tener en la salud humana (27). La estructura química de los principales estilbenos (25) se detalla en la Tabla 1.

■ **B. Flavonoides:** son pigmentos hidrosolubles, responsables de la coloración de las flores, frutos y, a veces, de las hojas. Se encuentran así las chalconas, auronas, flavonoles amarillos con los antocianósidos rojos, azules o violetas. Si no

Flavonoles	R1	R2
Kaempferol	H	H
Quercitina	OH	H
Miricetina	OH	OH
Isoramnetina	OCH ₃	H

Tabla2: Principales flavonoles (25)

son directamente visibles, contribuyen a la coloración por su papel de copigmentos, como ocurre con las flavonas y flavonoles incoloros que copigmentan y protegen a los antocianósidos. Los flavonoides se acumulan en las vacuolas y según las especies se concentran en la epidermis de las hojas y en la cutícula foliar, asegurando la defensa de los tejidos contra los efectos nocivos de las radiaciones ultravioletas (28)

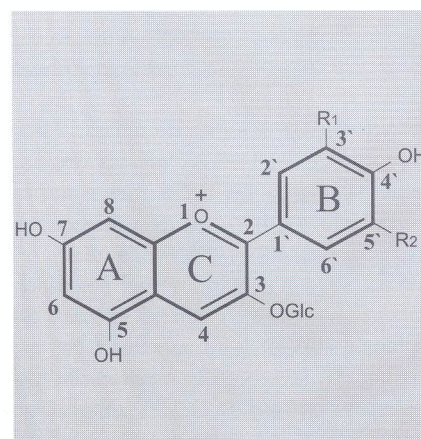
Estos compuestos presentan dos anillos bencénicos y un heterociclo central.

Incluyen cuatro grandes familias: flavonoles, flavanonoles, flavonas, antocianos y flavanoles. Esta última contiene a los taninos condensados o procianidinas (29)

Numerosos flavonoides y muchos fenoles reaccionan con los radicales, impidiendo de ese modo las degradaciones debi-

das a su intensa reactividad. Parece ser que la capacidad antioxidante de un flavonoide depende de su afinidad por los radicales y por tanto de su estructura (in vitro); los flavonoles son más activos que los flavanonoles que, a su vez, son más activos que las flavanonas (28).

■ **1. Flavonoles:** son los responsables del color amarillo de la piel de las uvas blancas y se encuentran presentes en el hollejo (30), en forma de aglicona o de heterósido, si bien algunos autores consideran que las agliconas son sólo producto de la hidrólisis durante los procesos de extracción (29). Los principales flavonoles presentes en vid son: kaempferol, quercitina, miricetina e isoramnetina. En la Tabla 2 se muestra la estructura química.



Antocianos

Antocianos	R1	R2
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH ₃	H
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

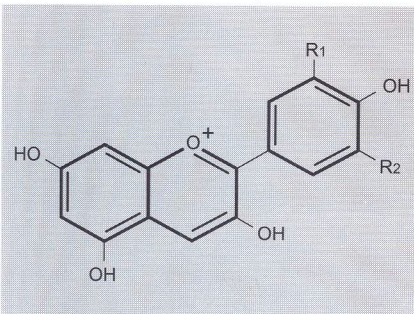
Tabla 3: Antocianos de vid. (25)

Area estomatología

■ **2. Flavanonoles y flavonas**, de estructura similar a los anteriores, su estructura química difiere en que no poseen el doble enlace del heterociclo (25).

■ **3. Antocianos** (del griego anthos -flor- y kyanos -azul-): este término fue utilizado por Marquat en 1835 para designar a los pigmentos azules de las flores, posteriormente se descubrió que los colores violeta, púrpura, magenta y los tonos rojos, rosados y escarlatas presentes en numerosas flores, frutos, hojas y raíces se deben también a estos pigmentos. En 1913, Willstatter y Everest propusieron que el término antocianina se empleara para el glicósido y antocianidina para la aglicona. Actualmente se utilizan indistintamente los términos antocianina y antociano para referirse al mismo pigmento (31).

Estos pigmentos se encuentran en forma de heterósidos (antocianósidos) y sus geninas (antocianidoles) son derivadas del catión 2 - fenilbenzopirilio, más comúnmente llamado catión flavilio (28). Están considerados dentro del grupo de los flavonoides porque poseen el esqueleto característico C6-C3-C6 y el mismo origen biosintético, pero difieren en que absorben fuertemente en la región visible del espectro (31). Su estructura química es la siguiente:



Según los sustituyentes en R1 y R2 se tiene la estructura de los diferentes antocianos. En otras especies existen otros antocianos como la pelargonina. En el género *Vitis* se hallan: cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina

(25). En la Tabla 3 se muestra la estructura de los antocianos presentes en vid:

Las agliconas de los antocianos se denominan antocianidinas; la cianidina es la más común y responsable del color magenta; el violeta y azul se deben a la delfinidina (con un grupo hidroxilo más). Cada antocianidina se presenta con unidades de azúcar, y la variación está en el tipo del azúcar, en el número y en la posición en la que están unidos (31).

Sólo la aglicona presenta características cromóforas. En la uva se localiza en los hollejos y en las variedades tintóreas también se encuentran en la pulpa. En el género *Vitis*, el antociano mayoritario es el monoglucósido de malvidina; hasta el momento se han determinado la presencia de 17 formas distintas (32).

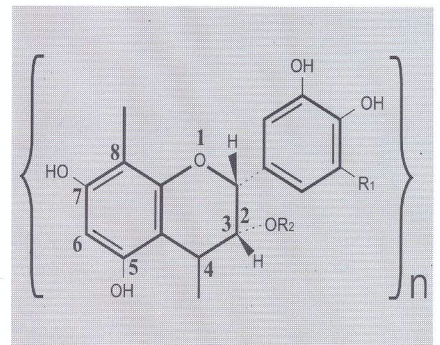
Otro aspecto a tener en cuenta es el hecho de que los antocianos presentan un equilibrio en función del pH entre formas químicas diferentes que condiciona su color (32 y 33). Así, en pH muy ácido la forma mayoritaria es el catión flavilio de color rojo, cuando el pH del medio aumenta se transforma en la base quinona de color violáceo y en la forma carbinol, incolora. Ambas reacciones tienen lugar simultáneamente de acuerdo con sus constantes de equilibrio (25).

■ **4. Flavonoles** (taninos condensados o procianidinas): Los flavonoles representan una compleja familia compuesta por diferentes formas isómeras de la catequina y sus polímeros (29).

La estructura básica de la catequina presenta dos carbonos asimétricos por lo que existen 4 isómeros (+)/(-) catequina y epicatequina. Además, el anillo aromático externo puede presentar un tercer grupo OH, dando lugar a las correspondientes (+)/(-) galocatequina y epigalocatequina. Por otra parte, el grupo OH en posición 3 del heterociclo puede estar galoilado, es decir que puede estar esterificado con una molécula de ácido gálico, por lo que también se pueden incluir los 3- galatos de (+)/(-) (galo) catequina y epi (galo) catequina.

En la uva los mayoritarios son (+)-catequina, (-) epicatequina y el 3-galato de (-) epicatequina. A continuación se muestra la estructura química de los monómeros del flavanol (Figura 2):

Los flavanoles polímeros reciben el nombre de taninos condensados y corresponden a cadenas de diferente número de unidades de los diversos flavanoles monómeros mediante enlaces C4-C8 o C4-C6. (35). Su estructura es la siguiente (25):



R1 = H: Procianidinas

R2 = OH: Prodelphinidinas

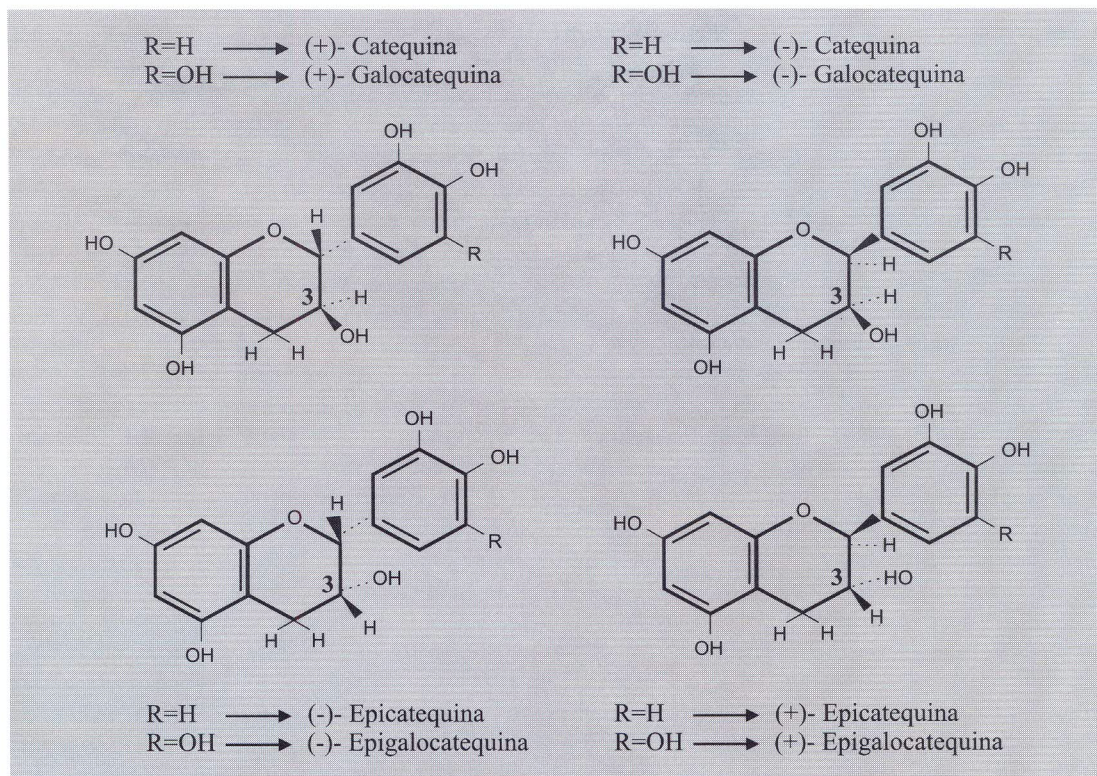
A los polímeros de flavanol o taninos condensados se los denomina procianidinas, debido a que en medio muy ácido dan lugar por hidrólisis a cianidina. Cuando están formados por unidades galocatequinas y/o epigalocatequinas se obtiene por hidrólisis ácida delfinidinas, designadas prodelphinidinas (36).

Los taninos de los hollejos están constituidos por procianidinas y prodelphinidinas y en las semillas se encuentran únicamente procianidinas parcialmente galoiladas (37).

Actividad terapéutica de taninos. Estos compuestos aplicados por vía tópica, impermeabilizan las capas más externas de la piel y las mucosas, protegiendo las capas subyacentes, tienen también un efecto vasoconstrictor sobre pequeños vasos superficiales. Al limitar la pérdida de fluidos e impedir las agresiones externas, los taninos favorecen la regeneración de los tejidos en caso de heridas superficiales o de quemaduras. Se ha demostrado tam-

Compuestos fenólicos, actividad antioxidante. Bases farmacológicas y su aplicación en medicina general y oral.

Figura 2:
Estructura química de los monómeros del flavanol



bién el efecto antiséptico, antibacteriano y antifúngico (28).

Maffei Facino y cols. (38), comprobaron que el poder antioxidante de las procianidinas presentes en las semillas de *Vitis vinifera* se debe a su capacidad de atrapar los radicales HO \cdot , iniciadores de las reacciones de lipoperoxidación y los radicales R \cdot , RO \cdot y ROO \cdot , responsables de la propagación y mantención de las reacciones que producen el daño microvascular, mediante la aplicación de dos modelos diferentes para la generación de los radicales libres, uno químico y otro fisicoquímico. Con el método químico demostraron que las procianidinas poseen actividad antilipoperoxidativa dosis dependiente, al inhibir la formación de TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) en un 98% a la concentración de 5 $\mu\text{mol/l}$. El efecto inhibitorio de procianidina, expresado como la concentración inhibitoria 50 (CI50 = 2,5 $\mu\text{mol/l}$, es superior al de cate-

quina (CI50 = 50 $\mu\text{mol/l}$), la unidad monomérica de procianidina usada como referencia. El segundo método consiste en la inducción de la lipoperoxidación por ultrasonido, este método permite diferenciar las distintas fases del proceso peroxidativo (39).

Acción farmacológica

Las antocianinas son compuestos vasoactivos con comprobada actividad antioxidante y antielastasa -esto fue descrito por Jonadet M. et al. en 1983 (40) y por Meunier M. et al., en 1989 (41). En tal sentido, han demostrado poseer propiedades captadoras de radicales superóxido e hidroxilo e inhibitoras de la peroxidación lipídica. A posteriori las antocianinas son consideradas como "los principales antioxidantes del reino vegetal" ya que bloquean la propagación de radicales libres, reforzando así la acción antiproteasa; e impiden que los radicales libres inac-

tiven las antielastasas naturales, tal como lo reportara Ríos Cañavate J (42) en 1995. Masquelieur J., en 1990, observó que las antocianinas pueden inhibir varios grupos enzimáticos, tales como elastasas, colagenasas, hialuronidasas y betaglucuronidasas (43). Maffei Facino R. et al., en 1994, comunicaron que todas estas enzimas intervienen en la constitución de la matriz extracelular de la piel y en el recambio de los principales componentes estructurales de la matriz extravascular: colágeno, elastina y ácido hialurónico (44). También ejercen un efecto inhibitorio no competitivo con la enzima xantina oxidasa, la que se encuentra relacionada con la formación de aniones superóxido.

Las antocianinas fueron testeadas en diferentes pruebas de toxicidad aguda y crónica, demostrando una alta seguridad. La dosis letal 50 (DL50) fue calculada en ratas y cobayos, siendo la misma de 4.000 mg/kg. Bertelli A., comunicó en 1982 que

Area estomatología

la administración oral de 60 mg/kg diarios de antocianinas durante seis meses a ratas y durante doce meses a perros no produjo efectos tóxicos, teratogénicos ni mutagénicos (45). Se puede emplear, para uso externo, la infusión de las hojas a razón de una cucharada de postre por taza (23 y 24).

Analizando la bibliografía con respecto a la actividad antioxidante de los flavonoides, se encuentra que *in vitro* el comportamiento de los flavonoles es más activo que el de las flavanonas. Son flavonoles: quercitina, kenferol, rutina, antocianinas.

Relacionando estos hallazgos con el conocido efecto nocivo del tabaco sobre el epitelio oral, se ha investigado el efecto del extracto de tabaco en la peroxidación lipídica, la reducción del citocromo c, la fragmentación del ADN y la muerte por apoptosis de los queratinocitos del epitelio oral normal, y se ha determinado el efecto protector de determinados antioxidantes seleccionados. Las células, aisladas y cultivadas de tejido oral normal, tratadas con el extracto de tabaco, fueron tratadas con: vitamina C (75 µM), vitamina E (75 µM), una combinación de C y E (75 µM de cada una), y extracto de antocianinas de las semillas de uva (100 µg/ml) y se determinó su actividad antioxidante contra el stress oxidativo y el daño tisular. Los resultados demostraron que el extracto de tabaco produce daño tisular oxidativo y apoptosis que puede ser atenuado por antioxidantes que incluyen a la vitamina C, a la vitamina E, a la combinación de ambas y al extracto de semillas de uva. El extracto de semillas de uva mostró una protección mayor que las de la vitamina C y E, solas o combinadas (46).

La inhibición del anión superóxido y del radical hidroxilo, en condiciones similares, fue del 78-81% para las antocianinas, del 12-19% para la vitamina C, y del 36-44% para la vitamina E succinato. Estos resultados demuestran que el extracto de semillas de uvas es un captador de radicales de oxígeno libre más potente que las vitaminas C y E (47).

TOXICIDAD

Numerosas investigaciones han demostrado la ausencia de efectos tóxicos en los tratamientos realizados hasta la fecha con antocianinas. Como parte de un programa para investigar la seguridad de los extractos de semillas de uva (ESU) y los extractos de piel de las uvas (EHU) se les estudió la actividad clastogénica *in vivo* a estos productos y o la disrupción de los aparatos mitóticos, detectando micro núcleos en los eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratas BR. A los animales se les dio 500, 1.000 y 2.000 mg/kg. Para ninguno de los extractos se encontró diferencia estadísticamente significativa que demostrara aumento de micronucleación, con lo que se evaluó como negativos a estos dos productos en el ensayo de micro núcleos en médula ósea, en las condiciones del ensayo (48).

Aunque los seres humanos han ingerido antocianinas fenólicas por siglos, sin efectos adversos reportados, la literatura en toxicología contiene poca evidencia formal respecto a su seguridad.

Como parte de un programa para investigar la seguridad del ESU y del EHU, estos productos fueron incorporados a la dieta de las ratas y se las alimentó al menos tres meses, para evaluar la toxicidad subcrónica. Al final del estudio se realizó necropsia con evaluación microscópica de todos los órganos. No hubo cambios relacionados con el tratamiento que puedan ser de significación tóxica. Entonces una concentración en la dieta del 2,5% de ESU o del 2,5% de EHU se consideró como de un nivel donde no se observan efectos colaterales adversos. Esto fue equivalente a 1,78 g/kg./peso corporal/día de uno de los dos extractos en machos y a 2,15 g/kg./peso corporal en ratas hembras (26). Se estudió la actividad antioxidante del ESU y de otros compuestos referentes midiendo su capacidad para captar el radical catión ABTS; los compuestos más efectivos fueron en orden: extracto de semillas de uvas >

na>catequina>diosmina> = ácido ascórbico. Los efectos radio protectivos se analizaron usando el test de micronúcleo para la actividad anticlastogénica, midiendo la reducción de la frecuencia de eritrocitos policromáticos multinucleados, evaluados en médula ósea de ratas expuestas a rayos X.

La mayor capacidad para captar el radical ABTS y la actividad anticlastogénica, puede ser explicada por un gran número de estructuras conjugadas entre los grupos catecol en los anillos y los grupos 3OH libres del esqueleto polifenólico polimérico, y además por la estabilidad del radical aroxil flavonoide generado en el proceso (49).

Se investigó además al ESU en su efecto preventivo en el tratamiento con radicales de oxígeno libre y para valorar su propia inducción de daño cromosómico en líneas celulares linfoblásticas humanas. El extracto estaba compuesto en el 89% por proantocianidinas con un grado de polimerización de entre 2 a 15 y no se observó daño cromosómico, o sea no es genotóxico y demostró un efecto preventivo del daño producido por H₂O₂ a través de una acción de captación directa de H₂O₂ (50).

La ingestión de extracto de semillas de uvas rico en proantocianidina se realizó durante seis meses en mujeres japonesas y demostró su seguridad y efectividad para el tratamiento del cloasma (51).

CONCLUSIÓN

Como síntesis se puede citar que los radicales libres se han implicado en más de cien condiciones humanas que incluyen: artritis, shock hemorrágico, aterosclerosis, edad avanzada, isquemia e injuria de reperusión de varios órganos, enfermedades de Alzheimer y Parkinson entre otras. Un gran número de antioxidantes sintéticos y naturales han demostrado inducir efectos beneficiosos en la salud humana y para prevenir enfermedades. Se ha estudiado la habilidad del extracto de

Compuestos fenólicos, actividad antioxidante. Bases farmacológicas y su aplicación en medicina general y oral.

proantocianidina proveniente de semillas de uva en modelos *in vitro* e *in vivo* comparado con vitamina C, E y carotenos. Estos experimentos demostraron que el ESU es altamente biodisponible y posee una protección significativamente mayor contra los radicales libres. Además se demostró su citotoxicidad para las células de adenocarcinoma de mama, pulmón y estómago, mientras mejora el crecimiento y la viabilidad de las células normales de la mucosa gástrica. El ESU también demostró excelente protección contra el daño

inducido por sobredosis de acetaminofeno en hígado y riñón regulando el gen bcl-X (L), el daño del ADN y presumiblemente reduciendo el stress oxidativo. El ESU demostró excelente protección contra la injuria por isquemia y reperfusión e infarto de miocardio en ratas. Además, se ha demostrado que sobre regula el gen bcl (2) e infla regula el oncogen c.myc. La aplicación tópica en voluntarios aumenta la protección solar y su administración crónica como suplemento dietario alivia la pancreatitis crónica en humanos. Estos

resultados demuestran que el ESU provee una excelente protección contra el stress oxidativo y la injuria mediada por radicales libres (52, 53, 54).

AGRADECIMIENTO

Se desea agradecer la experta e inestimable colaboración del Profesor Doctor Nelson E. Driban, sin cuya valiosa ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) **KAWANISHI S, HIRAKU Y.** Oxidative and nitrative DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8(5-6):1047-58.
- (2) **CHAIYARIT P, MA N, HIRAKU Y, ET AL.** Nitrative and oxidative DNA damage in oral lichen planus in relation to human oral carcinogenesis. *Cancer Sci* 2005; 96: 553 -559.
- (3) **BECKER JC, HOUBEN R, VETTER CS, ET AL.** The carcinogenic potential of tacrolimus ointment beyond immune suppression: a hypothesis creating case report. *BMC Cancer.* 2006 11; 6:7. *For Dentistry. 4th ed. St. Louis, Mo: Mosby-Year Book Inc, 1998, pp 644-55.*
- (4) **SCARDINA GA, MESSINA P, CARINI F, ET AL.** A randomized trial assessing the effectiveness of different concentrations of isotretinoin in the management of lichen planus. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 35(1):67-71.
- (5) **RON' GI, SHMELEVA LT, KLEIN AV, ET AL.** Lipid peroxidation and the status of the basal membrane of the acinar cells in the minor salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Stomatologija (Mosk).* 1992 ;(2):23-6. PMID: 1412534 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- (6) **FEMIANO F.** Damage to taste system and oral pain: burning mouth syndrome. *Minerva Stomatol* 2004; 53(9):471-8.
- (7) **BARKER KE, Savage NW.** Burning mouth syndrome: an update on recent findings. *Aust Dent J* 2005; 50(4):220-3; quiz 288.
- (8) **FEMIANO F, GOMBOS F, SCULLY C.** Burning mouth syndrome: the efficacy of lipoic acid on subgroups. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004; 18(6):676-8.
- (9) **FEMIANO F.** Burning mouth syndrome (BMS): an open trial of comparative efficacy of alpha-lipoic acid (thioctic acid) with other therapies. *Minerva Stomatol* 2002; 51(9):405-9.
- (10) **MA N, TAGAWA T, HIRAKU Y, MURATA, ET AL.** Nitroguanine formation in oral leukoplakia, a premalignant lesion. *Nitric Oxide* 2006; 14(2):137-43.
- (11) **BROCK GR, BUTTERWORTH CJ, MATTHEWS JB, ET AL.** Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol* 2004; 31(7):515-21
- (12) **MYERS RA, MARX RE** Use of hyperbaric oxygen in postradiation head and neck surgery. *NCI Monogr (9): 151-7, 1990.*
- (13) **SCHUBERT MM, EPSTEIN JB, PETERSON DE.** Oral complications of cancer therapy. In: Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ: *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry. 4th ed. St. Louis, Mo: Mosby-Year Book Inc, 1998. pp 644-55.*
- (14) **SONIS ST, PETERSON DE, MCGUIRE DB, EDS.** Mucosal injury in cancer patients: new strategies for research and treatment. *J Natl Cancer Inst Monogr (29): 1-54, 2001.*
- (15) **SONIS S, ELTING L, KEEFE D, ET AL.** Perspectives on cancer therapy- induced mucosal injury. *Cancer* 2004; 1008 9 Suppl): 1995-2025.
- (16) **WADLEIGH RG, REDMAN RS, GRAHAM ML, ET AL.** Vitamin E in the treatment of chemotherapy-induced mucositis. *Am J Med* 1992; 92 (5):481-4
- (17) **SARAL Y, COSKUN BK, OZTURK P, ET AL.** Assessment of salivary and serum antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with recurrent aphthous ulceration. *Toboku J Exp Med.* 2005 Aug; 206(4):305-12
- (18) **CIMEN MY, KAYA TI, ESKANDARI G, ET AL.** Oxidant/antioxidant status in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28(6):647-50
- (19) **YELDA KARINCA OGLU, KADIR BATCIOGLU, TAMER ERDEM, ET AL.** The levels of plasma and salivary antioxidants in the patient with recurrent aphthous stomatitis *J Oral Pathol & Med* 2005;34:7
- (20) **FREITAS JP, FILIPE P, YOUSEFIA, ET AL.** Oxidative stress in Adamantiades-Behcet's disease. *Dermatology* 1998; 197 (4): 343-8
- (21) **ERECXON GL.** Lack of *in vivo* clastogenic activity of grape seed and

grape skin extracts in a mouse micronucleus assay. *Food Chem Toxicol.* 2003; 41(3):347-50.

(23) KOWALCZYK E, KRZESINSKI P, KURA M, SKMIGIEL B, BLASZCZYK J. Anthocyanins in medicine. *Pol J Pharmacol* 2003;55, 699-702.

(24) ALONSO, J. (2007). Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Ed. Corpus. Rosario. Argentina. 1029-1033.

(25) ALONSO J. La uva (*Vitis vinifera*) Tratado de Fitomedicina, Bases Clínicas y Farmacológicas. Isis Ediciones SRL, Buenos Aires, 1998.

(26) ZAMORA, F. (2004). Elaboración y crianza del vino Tinto: Aspectos científicos y prácticos. Ed. AMV. Mundi-Prensa. España. Pp.18-28.

(27) LU, Y.R. Y FOO, L.Y. (1999). The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem.* 65, 1-8.

(28) CASCON, E., ROIG, R. ARDEVOL, A., SALVADO, M.J., AROLA, L. Y BLADE, C. (2001). Nonalcoholic components in wine reduce low density lipoprotein cholesterol in normocholesterolemic rats. *Lipids*, 36, 383-388.

(29) BRUNETON, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica Plantas medicinales. 2da Ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 305-365.

(30) CHEYNIER, V., MOUTOUNET, M. Y SARNI-MANCHADO, P. (2000). Los componentes fenólicos. En "Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos". Ed. C. Flanco, AMV Ediciones, Madrid. Pp 114-136.

(31) CHEYNIER, V. Y RIGAUD, J. (1986) HPLC separation and characterization of flavonoids in the skin of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *Am.J.Enol. Vitic.*, 37, 248-252.

(32) JULIAN C., RIVAS, G., CELESTINO SANTOS, B., LOOK, O. 2003. Antocianos en "Antocianos y betalainas. Colorantes naturales y Aplicación Industrial. CYTED, pp 26-37.

(33) BALDI, A. ROMANI, A. MULINACCI, N. VINCERI, F. Y CASETTA, B. (1995). HPLC/MS application to anthocyanins occurring in some red vines. *J.Agric. Food Chem*, 45, 35-43

(34) BROUILLARD, R. (1982) Chemical structure of anthocyanins. En "Anthocyanins as food color", Ed. P. Markakis, Academic press, New York, pp 1-40

(35) GLORIES, Y. (1984) La couleur des vins rouges. 2ème partie Mesure, origine et interpretation *Conn.Vigne Vin.*, 18, 253-271

(36) RICARDO DA SILVA, J.M., RIGAUD, J., CHEYNIER, V., CHEMINAT, A. Y MOUTOUNER, M. (1991). Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochem.*, 30, 1259-1264

(37) PORTER, L.J., HRSTICH, L.N. Y CHAN, B.G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochem.* 25, 223-230

(38) PRIEUR, C., RIGAUD, J., CHEYNIER, V. Y MOUTOUNET, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochem.*, 36, 781-784

(39) MAFFEI FACINO, R. CARINI, M., ALDINI, G., BOMBARDELLI, E. MORAZZONI, P., MORELLI, R. (1994). Free radicals Scavenging Action and Anti-Enzyme Activities of Procyanidines from

Vitis vinifera. Mechanism for their capillary Protective Action, *Arzneim-Forsch./Drug.Res.*44 (1), 5:592-601

(40) CORDOBA NEGRETE, R. 2003. Antioxidantes Naturales, Propiedades farmacológicas de las Antocianinas y sus derivados en "Antocianos y betalainas. Colorantes naturales y Aplicación Industrial. CYTED, pp 214

(41) JONADET M.; MEUNIER M.; BASTIDE J. AND BASTIDE P.: *Journal of Pharmacologie Belgique* N° 38, pp.41 (1983).

41 Meunier M.; Duroux E. and Bastide P.: *Plant médicinale et Phytothérapie* N° 23, pp. 267 (1989)

(42) RÍOS CAÑAVATE J.: *Fitoterapia de la Inflamación. Natura Medicatrix* N° 378, pp. 8085. (1995).

(43) MASQUELIEUR J.; Michaud J.; Laparra J. and Dumond M.: *Bulletin Society Pharmac. Bordeaux.* N° 118: 95 (1979).

(44) MAFFEI FACINO R.; CARINI M.; ALDINI G.; BOMBARDELLI E.; MORAZZONI P. AND MORELLI R.: *ArzneimForsch.* N° 44, pp. 592. (1994).

(45) BERTELLI A.: *Relazione farmacotossicologica. Istituto di Farmacologia Università degli Studi di Pisa. Indena S.P. A. (Data on file)* (1982).

(46) BAGCHI M, BALMOORI J, BAGCHI D, ET AL. Smokeless tobacco, oxidative stress, apoptosis, and antioxidants in human oral keratinocytes. *Free Radic Res.* 2001; 35(2):181-94

(47) BAGCHI D, GARG A, KROHN RL, ET AL. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1997 Feb; 95(2):179-89.

(48) BENTIVEGNA SS, WHITNEY KM. Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. *Food Chem Toxicol.* 2002 Dec; 40(12):1731-43.

(49) CASTILLO J, BENAVENTE-GARCIA O, LORENTE J, ET AL. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J Agric Food Chem* 2000; 48(5):1738-45.

(50) SUGISAWA A, INOUE S, UMEGAKI K. Grape seed extract prevents H(2)O(2)-induced chromosomal damage in human lymphoblastoid cells. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(9):1459-61.

(51) YAMAKOSHI J, SANO A, TOKUTAKE S, ET AL. Oral intake of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds improves chloasma. *Phytother Res* 2004; 18(11):895-9.

(52) BAGCHI D, BAGCHI M, STOHS SJ, ET AL. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 2000 7; 148(2-3):187-97.

(53) JAGETIA GC, REDDY TK. The grapefruit flavanone naringin protects against the radiation-induced genomic instability in the mice bone marrow: a micronucleus study. *Mutat Res* 2002 26; 519(1-2):37-48

(54) BLOCK KI, GYLLENHAAL C. Commentary: the pharmacological antioxidant amifostine -- implications of recent research for integrative cancer care. *Integr Cancer Ther* 2005; 4(4):329-51.