



FIGURA 1. Naranja. Foto: B. Vanaclocha

Los antioxidantes en la encrucijada: mitos y realidades

José Luis Ríos-Cañavate^a

Guillermo R. Schinella^b

^a Departamento de Farmacología
Facultad de Farmacia
Universidad de Valencia

^b Cátedra de Farmacología Básica
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de La Plata
CIC-PBA. Argentina

Dirección de contacto:

José Luis Ríos Cañavate
Departamento de Farmacología
Facultad de Farmacia
Universidad de Valencia
Av. Vicent Andrés Estellés s/n
46100 Burjassot (Valencia, España)
Tel.: +34 963544973
Fax: +34 963544498
E-mail: riosjl@uv.es

Resumen

El equilibrio entre generación y eliminación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno es necesario para mantener las funciones fisiológicas del organismo. Para ello se dispone de un sistema de defensa cuya función es la de eliminar las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, manteniendo así la homeostasis redox. Este sistema incluye componentes enzimáticos y no enzimáticos.

El aumento significativo de las especies reactivas producidas por el desequilibrio entre formación y eliminación genera estrés oxidativo, lo que puede dar lugar a pérdida de integridad celular y función enzimática, e inestabilidad genómica. Este daño oxidativo estaría involucrado en el envejecimiento y en enfermedades degenerativas. Para evitar estrés oxidativo y el daño producido, se propone la ingestión de compuestos antioxidantes, bien sean fitofármacos o suplementos alimenticios. Estos compuestos pueden actuar suprimiendo la formación o atrapando las especies reactivas, o bien aumentando o protegiendo el sistema de defensa antioxidante.

La popularidad de las sustancias antioxidantes ha llevado al uso indebido y al abuso de las mismas, apoyándose en estudios *in vitro* y extrapolando erróneamente los resultados a una posible eficacia *in vivo*.

La presente revisión destaca los mitos y realidades en el mundo de los antioxidantes, desvelando algunos aspectos desconocidos y la parte negativa del uso y abuso. Como ejemplos mal utilizados en este aspecto destacan las vitaminas A, C y E, fitoestrógenos, melatonina y resveratrol. Como conclusión final se establece que los antioxidantes son necesarios para la vida, pero su empleo como complemento o suplemento será de especial interés solo cuando exista una carencia o alteración fisiopatológica que así lo recomiende.

Palabras clave

Antioxidantes, estrés oxidativo, radicales libres, compuestos fenólicos.

Os antioxidantes na encruzilhada: mitos e realidades

Abstract

O equilíbrio entre a formação e a eliminação de espécies reactivas de oxigénio e azoto é necessário para manter as funções fisiológicas no organismo. Para isso o organismo possui um sistema de defesa antioxidante, que elimina estas espécies reactivas, mantendo assim a homeostase redox. Este sistema inclui componentes enzimáticos e não enzimáticos.

O aumento significativo de espécies reactivas produzidas pelo desequilíbrio entre a produção e a eliminação gera o stress oxidativo. Esta situação pode produzir a perda de integridade celular e função enzimática, bem como a instabilidade genómica. Este dano oxidativo poderá estar envolvido no processo de envelhecimento e nas doenças degenerativas. Para prevenir os efeitos oxidantes e os danos produzidos, é proposta a ingestão de antioxidantes, seja como medicamentos à base de plantas ou como suplementos alimentares. Estes compostos podem actuar por suprimir a formação ou por reagirem com as espécies reactivas, bem como aumentando ou protegendo o sistema de defesa antioxidante fisiológico.

Com base em estudos *in vitro* e extrapolando erradamente os resultados para uma possível eficácia *in vivo* tem-se fomentado a utilização indevida e abuso do consumo de antioxidantes.

Esta revisão destaca os mitos e realidades sobre os antioxidantes, revelando alguns aspectos desconhecidos e negativos de seu uso e abuso. Como exemplos de mau uso neste aspecto destacam-se as vitaminas A, C e E, fitoestrógenos, resveratrol e melatonina. Em resumo, os antioxidantes são necessários para a vida, mas a sua utilização como um complemento ou suplemento terá interesse especial apenas quando existe uma carência ou alteração fisiopatológica que assim o recomende.

Palavras-chave

Antioxidante, stress oxidativo, radicais livres, compostos fenólicos.

Introducción

En los últimos años, los antioxidantes han irrumpido con gran fuerza en el ámbito alimentario y sanitario, y como consecuencia de ello se ha desarrollado una amplia propaganda basada en una estrategia agresiva de comercialización, que ha comportado la asignación de numerosas virtudes fisiológicas y propiedades farmacológicas, hecho que ha dado lugar a un uso incorrecto y un abuso incontrolado, generando el desarrollo paralelo de una industria lucrativa

Antioxidants at the crossroads: myths and realities

Abstract

The balance between the generation and deletion of reactive oxygen and nitrogen species is necessary for maintaining the physiological functions in the organism. For this purpose, the organism has an antioxidant defense system, which eliminates these reactive species, maintaining the redox homeostasis. This system includes enzymatic and non-enzymatic components.

The significant increase in reactive species produced by the imbalance between generation and elimination generates oxidative stress. This situation may produce loss of cellular integrity and enzymatic function, as well as genomic instability. The oxidative damage would be involved in aging and degenerative diseases. To prevent the oxidative effects and damage, the intake of antioxidants such as herbal medicinal products or dietary supplement is proposed. These compounds may act by suppressing the formation or scavenging the reactive species, as well as increasing or protecting the physiological antioxidant defense system.

The popularity of antioxidants has led to the misuse and abuse of them, based on *in vitro* studies. The results obtained have been erroneously extrapolated to a possible efficacy *in vivo*.

This review highlights the myths and realities about the antioxidants, unveiling some unknown and negative aspects of their use and abuse. Examples of misuse in this aspect include vitamins A, C and E, phytoestrogens, resveratrol and melatonin. In summary, the antioxidants are necessary for life, but its use as a complement or supplement will be of special interest when there is a lack of them, or when in a pathophysiological alteration will be recommended.

Key words

Antioxidant, oxidative stress, free radicals, phenolics.

que vende el producto asociado a unas propiedades preventivas o curativas, en muchos de los casos sin ninguna razón justificada. Sin embargo, el paso del tiempo y la lógica sensatez, está demostrando que la antigua panacea no es tal, y aspectos otrora incuestionables están siendo ahora revisados, y en algunos casos rebatidos. Por todo ello, la Sociedad Española de Fitoterapia (SEFIT) consideró que era el momento de situar el tema en su justa medida, y consecuentemente organizó una jornada (Barcelona, 13 de

junio de 2014) con el fin de clarificar aspectos relativos a los antioxidantes y sus propiedades. En este sentido, se ha planteado realizar una revisión de los datos más relevantes de los últimos años acerca de los antioxidantes y sus propiedades. Pero antes de entrar en materia, se procederá en primer lugar a realizar unas preguntas básicas con el fin de situar el tema de revisión. Por ejemplo: ¿qué son los antioxidantes?, ¿dónde se localizan?, ¿son realmente efectivos en el tratamiento de diferentes patologías? Con la intención de contestar a estos aspectos básicos, se revisará el tema y se repasarán opiniones relevantes sobre el empleo de los antioxidantes en situaciones patológicas debidas o relacionadas con el estrés oxidativo, para finalizar con opiniones sobre uso y abuso de antioxidantes.

Especies reactivas y radicales libres

Desde un punto de vista estrictamente químico, se considera la oxidación como el proceso de ganancia de oxígeno o pérdida de electrones, y reducción a la pérdida de oxígeno o ganancia de electrones. Desde un punto de vista biológico, de forma escueta y abreviada, se puede considerar a una sustancia o agente como prooxidante cuando promueve el daño oxidativo, mientras que un antioxidante es el agente que lo inhibe ^(1, 2).

Un segundo aspecto más relevante para la fisiología y farmacología, y de mayor interés para el estudio de nuevos agentes naturales antioxidantes, son los conceptos de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN). Éstas incluyen a radicales libres y a moléculas no radicalarias derivadas del oxígeno y nitróge-

no. Ambos grupos tienen gran interés biológico y poseen una elevada reactividad ^(1, 2). Las principales ERO y ERN se recogen en la TABLA 1.

El tercer elemento a definir es el de radicales libres. Éstos son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón libre, son muy reactivos y su vida media es muy corta ^(1, 2).

La oxidación es un proceso esencial de los organismos aeróbicos y por tanto fundamental para sus vidas. En un estado fisiológico normal, la principal fuente de producción de las ERO es la cadena respiratoria mitocondrial. Las ERO también se generan en el retículo endoplásmico (por ejemplo el citocromo P₄₅₀), membrana celular (ej.: NADPH oxidasa), peroxisoma (ej.: acil-CoA oxidasa) y citosol (ej.: xantina oxidasa y óxido nítrico sintasa inducible), dependiendo del tipo celular y tejido. Las ERO también pueden generarse durante la metabolización de xenobióticos, exposición a radiaciones ionizantes y en diferentes situaciones fisiopatológicas ⁽³⁾. Las ERO y ERN intervienen en procesos biológicos vitales a través de la regulación de una variedad de procesos celulares, tales como proliferación, metabolismo y diferenciación ⁽³⁻⁶⁾.

En condiciones fisiológicas, el equilibrio entre generación y eliminación de especies reactivas es necesario para mantener la función adecuada de las proteínas involucradas en la señalización sensible a procesos redox ⁽⁷⁾. Para ello, el organismo posee un sistema de defensa antioxidante cuya función es la de eliminar ERO/ERN y así mantener la homeostasis redox. Este sistema incluye componentes enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), catalasas y peroxidasas; y no enzimáticos como la vitamina E,

	Radicales libres		Especies no radicales	
De oxígeno (ERO)	Superóxido	O ₂ ^{•-}	Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂
	Hidroxilo	HO•	Hidroperóxidos	ROOH
	Alcoxi	RO•	Hipoclorito	ClO ⁻
	Peroxi	ROO•	Oxígeno singlete	¹ O ₂
	Lípido radical	R•	Ozono	O ₃
	Radical carbonato	CO ₃ ^{•-}		
De nitrógeno (ERN)	Óxido nítrico	NO•	Peroxinitrito	ONOO ⁻
	Dióxido de nitrógeno	NO ₂ •	Aducto peroxinitrito/CO ₂	ONOOCO ₂ ⁻

TABLA 1. Principales ERO y ERN (radicales libres y no radicales) de interés biológico.

carotenos, ácido ascórbico, glutatión, péptidos-histidina, transferrina, ferritina, uratos y tioles de proteínas plasmáticas, siendo estos dos últimos de gran importancia por su capacidad captadora de radicales libres en el plasma sanguíneo ⁽⁴⁾.

El aumento significativo de ERO/ERN producido por desequilibrios entre los procesos de formación y el sistema de defensa antioxidante genera estrés oxidativo, el ataque no específico de las especies reactivas da lugar a la pérdida de integridad celular y de la función enzimática, dando lugar también a inestabilidad genómica. Este daño oxidativo estaría involucrado en el envejecimiento y en varias enfermedades degenerativas relacionadas con él, siendo ejemplos significativos las cataratas, disfunciones cognitivas, patologías cardiovasculares y cáncer ^(3,4).

Con el fin de combatir o evitar el estrés oxidativo y mejorar la eficacia del sistema de defensa, se propone la suplementación de la dieta con compuestos antioxidantes, lo que podría ayudar a disminuir la acumulación de los efectos oxidativos en dichas condiciones ⁽⁶⁾.

Sustancias antioxidantes

El concepto de antioxidante ha variado desde un concepto químico: "cualquier sustancia que cuando está presente en

bajas concentraciones en comparación con la de un sustrato oxidable retrasa significativamente o inhibe la oxidación de dicho sustrato" ⁽⁹⁾; a un enfoque más farmacológico: "cualquier sustancia que retrase, prevenga o elimine el daño oxidativo en una molécula diana" ⁽¹¹⁾. También hay que destacar en los antioxidantes la capacidad de formar un nuevo radical que sea estable posteriormente a su oxidación, después de atrapar al radical libre ⁽¹⁰⁾.

Otros conceptos focalizan más en los mecanismos. Así, los antioxidantes pueden ser comprendidos como "cualquier sustancia que neutraliza directamente o indirectamente las ERO, aumentando la actividad de las defensas antioxidantes o inhibiendo la producción de las ERO" ⁽¹¹⁾. Por tanto, se podrá considerar antioxidante a cualquier compuesto que actúe por alguno de los siguientes mecanismos (FIGURA 2) ^(12,13).

1. Suprimiendo la formación de ERO/ERN por inhibición de los sistemas enzimáticos que las generan o quelando los elementos metálicos que producen radicales libres.
2. Atrapando las ERO/ERN.
3. Aumentando o protegiendo el sistema de defensa antioxidante.

Diferentes estudios han demostrado la actividad antioxidante *in vitro* de una gran variedad de productos naturales,

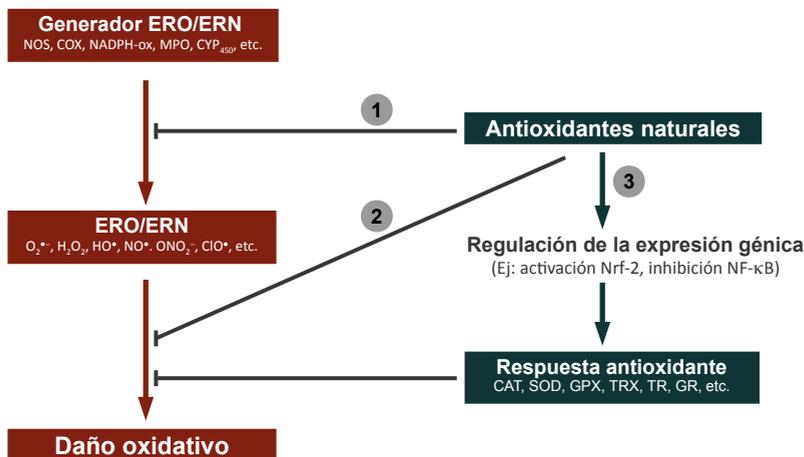


FIGURA 2. Diferentes mecanismos de acción de los antioxidantes: suprimiendo la formación de ERO/ERN por inhibición de los sistemas enzimáticos que las generan o quelando los elementos metálicos que producen radicales libres (1); atrapando las ERO/ERN (2); aumentando o protegiendo el sistema de defensa antioxidante, bien regulando la expresión génica de factores de transcripción implicados en el proceso o mediante la respuesta antioxidante de las enzimas inducidas (3). Adaptado de López-Alarcón y Denicola ⁽¹³⁾.

dejando evidencia de las propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos de origen vegetal ⁽¹⁴⁻¹⁹⁾. Sin embargo, es éste uno de los puntos más críticos a la hora de extrapolar los resultados obtenidos por los diferentes autores, ya que no existe certeza de que las propiedades de los principios fenólicos sean debidas "principal o exclusivamente" a su poder antioxidante. En la actualidad, se conoce que muchos compuestos antioxidantes ejercen sus acciones de protección contra el cáncer, diabetes o enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, no a través de sus propiedades redox, sino a su capacidad de interactuar con proteínas diana, inhibiendo enzimas, modulando receptores o factores de transcripción, y afectando a diferentes vías de transducción ^(20, 21).

De aquí surge la primera objeción a la generalización de antioxidantes como agentes farmacológicos, ya que una definición genérica de antioxidante no tiene validez si no se indica el "oxidante" neutralizado. Por tanto, el concepto de antioxidante y sus propiedades van a depender de los métodos utilizados para medir su actividad: no tiene sentido hablar de que "X" es mejor o más potente que "Y" a menos que se indique el tipo de ensayo ⁽¹⁾.

Métodos de estudio de antioxidantes *in vitro* e *in vivo*: ¿son válidos?

La actividad antioxidante es ampliamente usada como parámetro para caracterizar diferentes compuestos, y se relaciona con su capacidad para proteger un sistema biológico del efecto potencialmente dañino del estrés oxidativo. No existe un ensayo universal de actividad antioxidante *in vitro* debido a que la actividad antirradicalaria depende fundamentalmente de la naturaleza del radical y del método de generación del mismo, por lo que la elección de un sistema químico para generar especies reactivas es uno de los puntos críticos en el desarrollo de cualquier ensayo antioxidante con el fin de obtener resultados relevantes ^(14, 22). También existen métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante de muestras biológicas, algunos de ellos utilizan la producción de un radical orgánico o ERO, y otros se basan en la oxidación-reducción de iones metálicos.

Los sistemas *in vitro* más comunes son la determinación de la capacidad antioxidante total: reacción con los radicales 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH*) y 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) de amonio (ABTS**) y la determinación de la actividad reductora de Fe³⁺ (ensayo FRAP). Un segundo tipo de ensayos determina la actividad captadora de las ERO/ERN, tales como radical superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y peroxinitrito. Un

tercer grupo está constituido por la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica y el daño oxidativo de proteínas y ácidos nucleicos. También se puede estudiar la capacidad quelante de los iones ferroso (Fe²⁺) y cúprico (Cu²⁺).

El principal problema radica en la extrapolación de los resultados *in vitro* a datos *in vivo*. En este caso surge la pregunta: ¿son válidos los métodos *in vitro* para establecer el poder antioxidante de un compuesto *in vivo*? La respuesta debe ser clara y rotundamente negativa. Esto es debido a que los métodos estrictamente químicos se limitan a dar el poder quelante, reductor, etc., de un compuesto en un medio no fisiológico. Para evitar este inconveniente surgieron los estudios con diferentes líneas celulares, sin embargo, los medios de cultivo son claramente prooxidantes y además, salvo excepciones, se trabaja a una presión de O₂ de 150 mmHg, mientras que los tejidos humanos ésta varía entre 1-10 mmHg. Por tanto, se puede afirmar que los ensayos *in vitro* no tienen similitud con los sistemas biológicos habituales. En consecuencia, hay que dejar claro que los métodos *in vitro* pueden ser complementarios y útiles cuando se acompañan de otros *in vivo*, como biodisponibilidad, marcadores en plasma, orina, etc., pero nunca serán definitorios a la hora de establecer una potencial actividad en organismos vivos. Por otro lado, los antioxidantes no tienen capacidad de actuar a las concentraciones tisulares, pero sí pueden ayudar a controlar el exceso de ERO, protegiendo a las biomoléculas ^(23, 24).

Recientemente, se han establecido biomarcadores del daño oxidativo en tejidos humanos y fluidos corporales. Se ha observado que la administración de suplementos antioxidantes a individuos sanos o enfermos no cambia el nivel de los marcadores del daño oxidativo. Este hecho conlleva una cuestión fundamental: si los antioxidantes no modulan el daño oxidativo, ¿qué hacen? Los datos erróneos surgen cuando se extrapolan datos de animal a humano. Por ejemplo, las ratas y ratones son más sensibles a las dietas suplementadas con antioxidantes que los humanos, por lo que al extrapolar los resultados se llega a errores importantes. En el caso de muestras obtenidas de humanos, se puede establecer la presencia de isoprostano F₂ en tejidos y fluidos como un buen marcador de la peroxidación lipídica, y la 8-hidroxi-20-deoxiguanosina en orina como marcador del daño producido en ADN. Otros ensayos comunes deben ser usados con mucha precaución a la hora de su interpretación, mientras que otros marcadores rutinarios deberían evitarse, tales como los ensayos con ácido tiobarbitúrico y las determinaciones de la capacidad antioxidante total o biomarcadores comerciales generales (TABLA 2) ⁽²³⁾.

Como resumen se puede establecer que la determinación de la capacidad antioxidante total tiene ventajas, como son la simplicidad y bajo coste, lo que permite evaluar diferentes compuestos antioxidantes, así como su efecto sinérgico o antagonista en mezclas complejas o en sistemas biológicos. En otro sentido, las desventajas se pueden resumir en la falta de correlación entre los diferentes ensayos, la carencia de validez para enzimas, proteínas y otros antioxidantes indirectos, aunque sí son válidos para compuestos orgánicos. Por último, recordar que los ensayos no tienen similitud con las pruebas realizadas en sistemas biológicos, por lo que estos ensayos no pueden ser extrapolados a efectos sobre la salud en humanos. Sin embargo, los métodos pueden ser complementarios y útiles cuando se acompañan de otros protocolos, como son los estudios de biodisponibilidad y la determinación de marcadores en

plasma y orina, de acuerdo con los datos citados anteriormente ^(25, 26). En cualquier caso, el empleo de antioxidantes puede ayudar a controlar el exceso de ERO, protegiendo a las biomoléculas endógenas ⁽²⁵⁾.

Estrés oxidativo y antioxidantes

Aunque se ha planteado el estrés oxidativo como un aspecto negativo de la oxidación a nivel biológico, hay que tener en cuenta que ésta es esencial para la vida. El problema puede aparecer cuando la oxidación incontrolada se convierte en parte de la patogénesis, tal como se describe en la enfermedad cardiovascular, cataratas, Parkinson o Alzheimer, entre otras muchas. La pregunta que surge en esta situación es la siguiente: ¿es el exceso de oxidación la causa o el efecto de la enfermedad? ⁽²⁷⁾. El estrés oxidativo producto del daño tisular ¿tiene alguna función en la patología de la enfermedad? En algunas situaciones se pueden establecer relaciones directas entre la patología y el proceso oxidativo, como en cáncer, enfermedades neurodegenerativas e inflamación intestinal. En otras, el proceso oxidativo puede estar implicado, como en la aterosclerosis. Sin embargo, en enfermedades crónicas como artritis reumatoide y otras, la relación causa-efecto puede ser difícil de establecer, ya que en algunos casos puede ser positiva al incrementar la defensa endógena del organismo. En otros como diabetes, la disminución de ERO es positiva, ya que éstas dañan a las células- β , pero su total eliminación puede provocar disfunción metabólica y predisponer a la diabetes ⁽²⁸⁾.

Otra cuestión relacionada con el estrés oxidativo y antioxidantes es: ¿son siempre nocivas las EROS/ERN para el individuo? La respuesta es claramente negativa, puesto que las especies reactivas también pueden resultar beneficiosas para el organismo, ya que algunas actúan como mediadores celulares y otras intervienen como elementos de defensa en caso de infección. En el primer caso destaca el óxido nítrico (NO), sintetizado por diferentes tipos celulares a partir de L-arginina y la óxido nítrico sintasa (NOS). El NO es un radical libre que actúa como factor relajante del endotelio vascular en células endoteliales de vasos y bronquios, pero también tiene funciones como neurotransmisor.

El efecto de NO en procesos biológicos es aprovechado por diferentes fármacos que aumentan su nivel tisular produciendo efectos beneficiosos. Es el caso de la vasodilatación producida por los activadores de la guanilil ciclasa, como los nitratos y nitritos (nitroglicerina, dinitrato de isosorbida y otros), utilizados en el tratamiento de diferentes patologías cardiovasculares. También los inhibidores selectivos

Biomarcadores de interés para estudios en humanos

- F₂-Isoprostanos en tejidos y fluidos corporales (peroxidación lipídica)
- 8-Hidroxi-20-deoxiguanosina en orina (marcador de daño en ADN)

Biomarcadores utilizables con precaución en la interpretación

- Oxidación de productos del colesterol (peroxidación lipídica)
- Oxidación de hidroperóxidos de ácidos grasos/hidróxidos (peroxidación lipídica)
- Ensayo de peróxidos (peroxidación lipídica)
- 8-Hidroxi-20-deoxiguanosina en orina
- Oxidación de bases de ADN en ácido nucleico aislado de células
- Determinaciones químicas directas (malondialdehído) con proteínas y ácidos nucleicos
- Determinación cromatográfica (HPLC) de ácido tiobarbitúrico (TBA)

Marcadores que deben ser evitados

- Ensayos simples con ácido tiobarbitúrico (TBA)
- Determinación de la capacidad antioxidante total

TABLA 2. Principales biomarcadores utilizados para estudiar en daño oxidativo en tejidos humanos y fluidos corporales como antioxidantes ⁽²³⁾.

de la fosfodiesterasa-5, que evitan la degradación del GMPc en el cuerpo cavernoso, aumentando el NO y en consecuencia producen dilatación de los vasos sanguíneos. Este es el mecanismo del sildenafilo (Viagra®), tadalafilo (Cialis®) y vardenafilo (Levitra®), y que tratan de justificar algunas compañías de complementos alimenticios con L-arginina que se introducen en el mercado como “óxido nítrico”, compuesto que no puede ser administrado en cápsulas, ya que se trata de un gas con semivida muy fugaz.

También se ha acumulado evidencia que muestra que los oxidantes endógenos, tal como el H_2O_2 , pueden actuar como segundos mensajeros y desencadenar respuestas intracelulares que regulan la expresión de enzimas antioxidantes y detoxificantes ⁽¹³⁾.

En el segundo caso están las especies $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HOCl y ONOO⁻, producidas por las células fagocíticas para destruir los microorganismos, proceso de gran relevancia en la respuesta inmune innata ⁽²⁸⁾.

Antioxidantes: ¿mitos o realidades?

Históricamente se desarrolló un concepto negativo de prooxidante y positivo de antioxidante. Sin embargo, tras las recientes aportaciones científicas, se han puesto en entredicho algunos dogmas clásicos. Aparecen nuevas paradojas, como el concepto positivo de prooxidantes y se cuestionan muchos de los efectos positivos de los antioxidantes ^(1, 23, 29).

Uno de los problemas surgidos en estos pasados años fue el considerar a los antioxidantes como la panacea frente a todas las enfermedades en las cuales el estrés oxidativo está implicado, así como para retardar el envejecimiento, lo cual ha llevado a su aplicación masiva como aditivo alimentario, cosmético o medicamento, con un gasto de varios millardos (“billions”) de euros al año. ¿Pero está justificado este abuso?: la respuesta es una vez más ineludiblemente negativa. Diversos estudios demuestran que la administración masiva de sustancias antioxidantes como preventivas frente a diferentes patologías es en la mayoría de los casos ineficaz, y en algunas situaciones es claramente negativa. Así, un estudio en Finlandia (Alpha-tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study o ATBC) con personas con factores de riesgo de padecer cáncer de pulmón (fumadores y bebedores), se le administró de forma crónica α -tocoferol, β -caroteno o ambos. En todos los casos hubo un mayor incremento de riesgo en los tratados que en el placebo ⁽³⁰⁾. En otro estudio (*Physician' Health Study*) realizado durante 12 años con 22.000 individuos, se administraron 50 mg de β -caroteno/paciente, y la eva-

luación de los resultados indicó que no le produjo efecto protector a los voluntarios, aunque tampoco aparecieron efectos indeseables o tóxicos reseñables ⁽³¹⁾. En el (CARET) la administración de 30 mg de β -caroteno y 25.000 U de retinol se asoció a un incremento del 28% del riesgo en el grupo tratado con β -caroteno, respecto al grupo placebo ⁽³²⁾. Como conclusión, se establece que de forma general, muchas de las propiedades de estos compuestos “antioxidantes” no son tales, ya que sus propiedades beneficiosas están relacionadas con un mecanismo específico, que dista mucho de ser el de un antioxidante ⁽²⁷⁾.

Un estudio más selectivo evaluó el efecto de los antioxidantes en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Para ello se seleccionaron mujeres de mediana edad con riesgo enfermedad cardiovascular y se demostró que no existen evidencias de posibles ventajas debidas a suplementos con vitaminas C, E y β -caroteno en la prevención primaria de diabetes tipo 2. En un estudio complementario realizado con mujeres de mediana edad bajo estrés oxidativo, con diabetes tipo 2 diagnosticada y genotipo haptoglobina 2-2, se observó una reducción significativa de eventos cardiovasculares tras recibir durante año y medio suplementación con vitamina E. Sin embargo, este hecho es debido a que la haptoglobina es una glicoproteína con propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras, no al efecto antioxidante directo del suplemento administrado ^(33, 34).

Todo lo anteriormente expuesto nos lleva a pensar en que las propiedades antioxidantes no son en la mayoría de los casos las responsables de la actividad farmacológica de compuestos y fármacos utilizados para tal fin, pudiendo ser su administración indiscriminada en algunos casos potencialmente dañina para la salud. Algunos ejemplos de compuestos utilizados erróneamente como antioxidantes son citados a continuación.

Sustancias antioxidantes cuya actividad no es debida a estas propiedades

Fitoestrógenos

Las isoflavonas, genisteína y otras, tienen propiedades antioxidantes *in vitro*, pero su mecanismo de acción farmacológico se debe a su capacidad de unirse al receptor estrogénico (ER)- β . El propio estradiol también es antioxidante, sin embargo, la baja concentración de estrógenos en el organismo hace que esta propiedad no tenga una relevancia directa. En el caso de la genisteína, las concentraciones plasmáticas están en el orden de 50-500 ng/mL, valores que hacen altamente improbable que ejerzan un efecto antioxidante directo.

A concentraciones fisiológicas, los estrógenos activan el receptor ER β y las vías de transcripción de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) y del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B). La estimulación de este factor de transcripción por estrógenos activa la expresión de superóxido dismutasa tipo 2 (Mn-SOD) y glutatión peroxidasa (GPx). Por tanto, aunque en el efecto farmacológico aparecen las propiedades antioxidantes, éstas no son debidas a una acción directa sino indirecta, mediada por la sobreexpresión de genes implicados en la producción de enzimas con propiedades antioxidantes ⁽³⁵⁾.

Ácido ascórbico

La vitamina C actúa más como agente reductor que como antioxidante, especialmente cuando hay bajo contenido molecular de hierro. El ácido ascórbico junto al hierro promueve la peroxidación lipídica, sin embargo, la vitamina C a altas concentraciones la inhibe, actuando por tanto como prooxidante a baja concentración y como antioxidante a alta concentración ⁽³⁶⁾. En cualquier caso, la función principal del ácido ascórbico en el organismo es su participación en la síntesis de colágeno, hormonas esteroideas y carnitina, así como en el metabolismo de lípidos, tirosina, y otros compuestos. Además, neutraliza radicales libres como hidroxilo o superóxido, y es cofactor de las hidroxilasas. La pregunta común es: ¿previene el ácido ascórbico contra cáncer, asma, aterosclerosis o resfriados? La respuesta es una vez más negativa ^(37,38).

Melatonina

Al igual que otras moléculas fisiológicas, la melatonina posee propiedades antioxidantes, pero su efecto hormonal no está relacionado con ellas, ya que su actividad se produce vía receptor acoplado a proteína G, cuya función está

relacionada con la regulación de los ciclos del sueño y la vigilia en el hombre. Sin embargo, existen en los mercados “alternativos” la idea y promoción de la melatonina como “hormona de la juventud”, virtudes que se achacan a sus propiedades antioxidantes. No es el caso, y por tanto los efectos positivos en el sistema cardiovascular y nervioso, así como algunas propiedades relacionadas con el aparato reproductor, son consecuencia de su efecto hormonal, más que a sus propiedades antioxidantes ⁽²⁾.

Retinol

La vitamina A se comporta como antioxidante *in vitro*, por lo que se ha aconsejado para tal fin, pasando a ser recomendada como complemento alimenticio, con la idea errónea de disminuir los daños producidos por el estrés oxidativo. Independientemente de que estas propiedades *in vitro* sean reales, el mecanismo de acción del retinol está relacionado con su capacidad de formar un complejo con opsina para dar lugar a rodopsina que interacciona con la luz y cumple su función fisiológica (FIGURA 3). En este mecanismo no se produce un proceso redox /antioxidante ⁽³⁹⁾.

Resveratrol

Desde hace años se habló de la paradoja francesa y especialmente se ha centrado parte de su justificación en las propiedades del vino tinto. Con el aislamiento del resveratrol y los posteriores estudios realizados con esta molécula, se estableció su potencial beneficioso, justificándolo en parte por sus propiedades antioxidantes. De esta forma se han comercializado extractos con alto contenido en resveratrol con fines preventivos en diferentes facetas de la salud, entre las que destaca su efecto protector cardiovascular. ¿Pero tiene realmente el resveratrol propiedades cardioprotectoras?, y en caso de respuesta positiva, ¿está relacionado el efecto beneficioso con las propiedades anti-

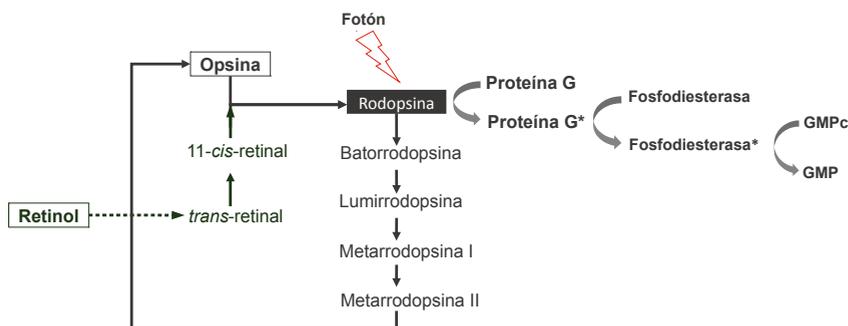


FIGURA 3. Mecanismo de acción del retinol (vitamina A).

oxidantes? Algunos estudios demuestran que la protección cardiovascular del vino tinto es independiente de su poder antioxidante y su contenido en resveratrol. Efectivamente, Mosca *et al.* ^(40, 41) fraccionaron un extracto activo de vino tinto, y utilizando un ensayo de isquemia y reperfusión con corazón aislado de rata, demostraron que la fracción cardioprotectora no contenía resveratrol, aunque la fracción activa estaba enriquecida en proantocianidinas solubles.

Otras propiedades relacionadas con el resveratrol, como las anticancerosas o antienvjecimiento, se han vinculado con la activación de mecanismos bioquímicos concretos. En el año 2003 se publicó que resveratrol tenía la capacidad de unirse y activar la sirtuina-1, proteína que se ha relacionado con la reducción de la resistencia a la insulina, envejecimiento y regulación de la ingesta (FIGURA 4). Por tanto su mecanismo es independiente de sus propiedades antioxidantes ⁽⁴²⁾.

Fenoles y polifenoles como antioxidantes

Las especies vegetales más utilizadas en fitoterapia tienen generalmente un alto contenido en compuestos fenólicos, principios que siempre se relacionan con propiedades antioxidantes. Los derivados fenólicos simples, como flavonoides, cumarinas, lignanos, fenilpropanoides, o los denominados polifenoles de estructura más compleja, como proantocianidinas y taninos catéquicos, así como los derivados del ácido gálico (galotaninos), son principios conocidos por su capacidad antioxidante. De forma general se puede considerar que estos principios tienen potencial interés farmacológico en patologías asociadas con la generación de ERO, en las cuales pueden evitar el daño oxidativo. Pero, ¿pueden actuar los fenoles como compuestos antioxidantes?: en este caso la respuesta es positiva, haciéndolo por diferentes mecanismos. Por ejemplo, captando ERO, inhibiendo enzimas generadoras de ERO, induciendo enzimas del sistema de defensa antioxidante, y como agentes quelantes ^(2, 24).

Recientemente se han descrito otras paradojas de los compuestos fenólicos, ya que se han referido efectos contradictorios, ante lo cual cabe preguntarse: ¿son los polifenoles antioxidantes o prooxidantes? Los polifenoles se oxidan en bebidas como el té verde o en medios de cultivo celulares, e incluso en la cavidad oral. De esta forma, se pueden generar cantidades importantes de O₂^{•-}, H₂O₂ y mezclas complejas de semiquinonas y quinonas con alto poder citotóxico ⁽²⁴⁾. Estos efectos prooxidantes pueden ser considerables en el tracto gastrointestinal, debido a la mayor concentración de componentes a ese nivel. Sin

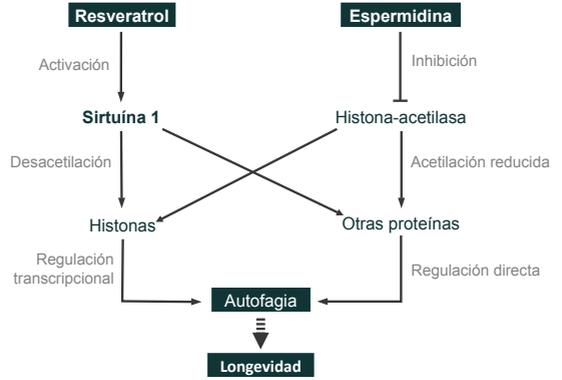


FIGURA 4. Mecanismo de acción del resveratrol.

embargo, en la práctica, los efectos prooxidantes pueden ser beneficiosos, ya que se genera un grado leve de estrés oxidativo que aumenta las defensas antioxidantes, incrementando el nivel de enzimas metabolizantes de xenobióticos y dando lugar a citoprotección ⁽²⁴⁾.

Otro aspecto de interés en el caso de los alimentos, bebidas y suplementos ricos en polifenoles, como vino tinto, granada, chocolate, té verde o yerba mate, es conocer si los efectos antioxidantes demostrados *in vitro* son efectivos también *in vivo*. En estos casos existen resultados contradictorios, demostrando efectos antioxidantes positivos en algunos casos, negativos en otros y prooxidantes a veces ⁽²⁴⁾.

En el caso de los flavonoides no hay una clara evidencia de las propiedades prooxidantes en humanos. Además, los flavonoides no son solo antioxidantes o prooxidantes, ya que se han descrito otros efectos, como la capacidad de inhibir ciclooxigenasas, lipoxigenasas, metaloproteinasas y NADPH oxidasas, siendo estas acciones de mayor relevancia *in vivo* que las propiedades antioxidantes. Sin embargo, muchos efectos se han demostrado a altas dosis y por tanto a concentraciones no fisiológicas ⁽²⁴⁾.

Como resumen de las propiedades de los compuestos fenólicos, se puede concluir que más allá de su capacidad como captadores de radicales libres o quelantes de metales, hay que considerar otros mecanismos fisiológicos y bioquímicos. Estos mecanismos están relacionados con la capacidad de interacción principio fenólico-proteína y principio fenólico-lípido, lo que puede dar lugar a interacciones físicas y químicas, que podrían desencadenar diferentes respuestas celulares. Los mecanismos debidos a la interacción de principios fenólicos con biomoléculas son más

consistentes con los efectos observados *in vivo*, tanto en animales como humanos ⁽⁴³⁾.

Farmacocinética de los compuestos antioxidantes

Otra de las objeciones repetidas sobre los antioxidantes es su baja biodisponibilidad, especialmente en el caso de los polifenoles. En algunos estudios se ha referido que los polifenoles sufren un metabolismo digestivo previo por la microbiota intestinal, pasando a circulación y el posterior metabolismo tisular da lugar a los monómeros correspondientes. La mayoría de los compuestos fenólicos son metabolizados a *O*-metil-derivados o glucurónidos, y muchos de ellos mantienen sus propiedades biológicas-farmacológicas, ya que en general no son dependientes del poder antioxidante (FIGURA 5) ⁽¹⁾. Pero uno de los aspectos que se cuestionan es si los compuestos originales activos *in vitro* son los que ejercen el efecto deseado, o son los derivados producidos durante el metabolismo. En el caso de los polifenoles del cacao existen ciertas controversias. A la pregunta de si son las procianidinas estables en medio ácido, Spencer *et al.* ⁽⁴⁴⁾ dicen que no, que se degradan debido al pH gástrico, mientras que Rios *et al.* ⁽⁴⁵⁾ afirman lo contrario. Independientemente de las diferencias en los experimentos *in vitro*, Williamson ⁽⁴⁶⁾ demostró que la epicatequina, monómero de las procianidinas presente también en forma libre, se absorbe bien en digestivo y se excreta en orina.

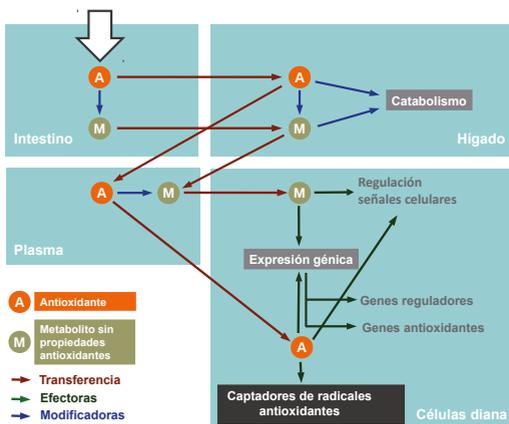


FIGURA 5. Metabolismo de antioxidantes: generación de metabolitos activos (adaptado de Azzi *et al.* 2004) ⁽²⁾.

Conclusiones

Como conclusiones generales valen las ideas establecidas recientemente por Bast y Haenen ⁽³⁶⁾. Estos autores repasan y establecen lo que a su criterio son los 10 conceptos erróneos acerca de los antioxidantes, los cuales se pueden resumir en los siguientes puntos:

1) *Curan cualquier enfermedad.* La mayoría de los estudios realizados son *in vitro* y los resultados son extrapolados a *in vivo*. Independiente del potencial teórico, hay que recordar que los principios requieren un proceso de absorción y metabolismo para llegar a sangre y tejido, por tanto, no se puede concluir que una buena actividad *in vitro* sea suficiente para prevenir cualquier enfermedad asociada a estrés oxidativo o radicales libres. Actualmente se están relacionando los efectos de antioxidantes con su influencia sobre ADN (epigenética), lo que lleva al mismo error al tratarse de experimentos *in vitro*.

2) *Pueden incrementar la morbilidad y mortalidad.* Estudios recientes han relacionado el incremento de la mortalidad con el uso de algunos complementos dietéticos enriquecidos con antioxidantes. Por ejemplo, el empleo de vitamina E en protección cardiovascular o los antioxidantes en la prevención de cáncer, podría ser contraproducente, ya que se ha descrito que el bloqueo de la apoptosis por antioxidantes podría favorecer el desarrollo del cáncer en vez de proteger su aparición. Sin embargo, estos estudios son sesgados y aislados, de forma que diferentes estudios obtiene conclusiones dispares, ya que trabajan con protocolos no equiparables a situaciones fisiológicas reales. Por ello, se puede considerar que no hay relación directa entre el supuesto incremento de morbilidad/mortalidad y el consumo de antioxidantes. Como norma general se debe plantear el hecho de que hay que conocer el estado del individuo, ya que lo que es bueno para uno puede ser fatal para otro.

3) *Más es mejor.* Cualquier compuesto a altas dosis puede tener efectos negativos para la salud, o al menos no incrementar el efecto. Como ejemplos de abuso en la dosificación tenemos los ya comentados del ácido ascórbico y β -caroteno. En el primer caso no se ha podido demostrar que megadosis de vitamina C sean útiles para la persona, y en el segundo grupo de estudios se han descrito casos de incremento de incidencia en cáncer de pulmón con dosis altas de β -caroteno. Por tanto, más no es mejor, sino que hay que encontrar la relación dosis-efecto.

4) *A altas dosis se vuelven prooxidantes.* Ya se ha comentado anteriormente el potencial prooxidante de algunos compuestos. Los antioxidantes son reductores (donantes

de e⁻¹) y en presencia de metales de transición, los donantes de e⁻¹ pueden volverse prooxidantes. Esto ha sido repetidas veces descrito en estudios *in vitro* con vitamina C y Fe. Sin embargo, algunos de estos efectos no siempre se han podido demostrar *in vivo*.

5) *Cualquier antioxidante vale*. No todos los antioxidantes tienen el mismo efecto ni la misma potencia. Existen distintos grupos activos con diferente respuesta farmacológica. También existen derivados hidrófilos e hidrófobos, e incluso mixtos, con dos partes diferenciadas en la molécula, lo que hace que tengan diferente comportamiento.

6) *En condiciones habituales no pueden comportarse como tales*. En teoría los antioxidantes deben reaccionar muy rápido para evitar el daño de los radicales libres, lo que podría hacer que no fueran efectivos. Esto es válido en casos como el radical hidroxilo, pero no en la peroxidación lipídica que afecta a las membranas biológicas, ya que la semivida de los radicales formados es alta y son fácilmente neutralizables. Además los antioxidantes tienen otros efectos indirectos, que están implicados en los procesos oxidativos, afectando la actividad enzimática o interfiriendo con factores de transcripción celulares.

7) *El estado antioxidante del organismo mide su salud*. En general los datos *in vitro* son extrapolados y no tienen equivalencia *in vivo*. En todo caso, el estado antioxidante se determina en una muestra biológica concreta, pero no en todo el organismo. ¿Y en plasma? Este valor refleja el estado antioxidante debido a todos los compuestos circulantes en un momento dado. En general, el estado antioxidante puede ser tomado en cuenta como indicador de enfermedad, pero siempre acompañado de otros valores bioquímicos.

8) *Una vez utilizados y ejercido el efecto se inactivan*. Aunque son muchos los principios que una vez metabolizados se desactivan, este hecho no siempre es cierto, ya que hay compuestos como el ácido dihidrolipoico que se oxida a lipoico durante el proceso antioxidante, pero este metabolito es un eficaz captador de radical HOCl. Además, existen redes de regeneración de metabolitos, como algunos glucuronidos que pueden ser reutilizados por macrófagos. Ciertos metabolitos mantienen una actividad, e incluso se transforman en compuestos de mayor interés.

9) *Los compuestos naturales son superiores a los sintéticos*. La creencia de que el producto de síntesis es peor que el natural no es real. Por ejemplo, el α -tocoferol natural (isómero *R,R,R*- α -tocoferol) es más activo que otros derivados sintéticos, pero el derivado sintetizado con el mismo tipo estructural tiene la misma actividad. Esto es válido

también para el ácido ascórbico, donde las moléculas naturales y sintéticas son bioequivalentes.

10) *Los fármacos que además tienen propiedades antioxidantes no hacen nada*. Existen fármacos con actividad específicas, como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o los bloqueantes canales de calcio, que además de su actividad farmacológica tienen propiedades antioxidantes. Muchas veces, éstas se manifiestan solo a altas concentraciones, por lo que se hipotetiza que no son útiles para una actividad antioxidante. Sin embargo, se ha descrito que fármacos concretos pueden activar factores de transcripción (ej.: Nfr2) y generar enzimas antioxidantes endógenas (HO-1, NQO1, Gcl, UGT1A1, UGT1A6, GST), con lo cual manifiestan un efecto indirecto.

Como corolario podríamos establecer que las sustancias antioxidantes, al igual que el agua, la sal o el azúcar, son necesarias para la vida. Su empleo como complemento o suplemento será de especial interés cuando exista una carencia o alteración fisiopatológica que así lo recomiende. Pero, como en el caso de los elementos citados, el exceso no es bueno, e incluso puede ser claramente dañino.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado en el marco del Programa de Incentivos a Docentes-Investigadores (11/M169) de la Secretaría de Políticas Universitarias del Ministerio de Educación, Argentina.

Referencias bibliográficas

- Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393: 561–564.
- Azzi A, Davies KJ, Kelly F. Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Lett* 2004; 558: 3–6.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239–247.
- Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MKT, Mazura M, Tesler J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44–84.
- Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 2011; 194: 7–15.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 2012; 24: 981–990.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Rivera-del Valle N, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1343–1374.
- Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1994; 32: 671–683.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 125–126.

10. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun* 1990; 9: 1–32.
11. Khlebnikov AI, Schepetkin IA, Domina NG, Kirpotina LN, Quinn MT. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 1749–1770.
12. Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 2013; 51:15–25.
13. López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta* 2013; 763: 1–10.
14. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 2005; 43: 4290–4302.
15. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 1997; 2: 152–159.
16. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000; 63: 1035–1042.
17. Cos P, Calomme M, Pieters L, Vlietinck J, Vanden Bergh D. Structure-activity relationship of flavonoids as antioxidant and prooxidant compounds. En: *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 22), Atta-ur-Rahman (Ed.), Elsevier, Amsterdam, 2000. pp. 307–341.
18. Pannala AS, Chan TS, O’Biren J, Rice-Evans C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 282:1161–1168.
19. Brewer MS. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2011; 10: 221–247.
20. Zhang HY, Chen LL, Li XJ, Zhang J. Evolutionary inspirations for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31: 443–448.
21. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységú L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed* 2011; 50: 586–621.
22. Aruoma OI. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat Res* 2003; 523-524: 9–20.
23. Halliwell, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis?. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32:125–130.
24. Halliwell, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys* 2008; 476: 107–112.
25. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 1841–1856.
26. Fraga CG, Oteiza PI, Galleano M. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840: 931–934.
27. Azzi A. How can a chemically well established antioxidant work differently when in the body?. *IUBMB Life* 2009; 61: 1159–1160.
28. Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 2012; 70: 257–265.
29. Halliwell, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now?. *Br J Clin Pharmacol* 2013; 75: 637–644.
30. Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M, Hartman AM, Palmgren J, Freedman LS, Haapakoski J, Barrett MJ, Pietinen P, Malila N, Tala E, Liippo K, Salomaa ER, Tangrea JA, Teppo L, Askin FB, Taskinen E, Erozan Y, Greenwald P, Huttunen JK. α -Tocopherol and β -carotene supplements and lung cancer incidence in the Alpha-tocopherol, Beta-carotene Cancer Prevention Study: effects of base-line characteristics and study compliance. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1560–1570.
31. Sesso HD, Buring JE, Christen WG, Kurth T, Belanger C, MacFadyen J, Bubes V, Manson JE, Glynn RJ, Gaziano JM. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians’ Health Study II randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 300: 2123–2133.
32. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL Jr, Valanis B, Williams JH Jr, Barnhart S, Cherniack MG, Brodtkin CA, Hammar S. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1550–1559.
33. Meydani M, Azzi A. Diabetes risk: antioxidants or lifestyle?. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 253–254.
34. Song Y, Cook NR, Albert CM, Van Denburgh M, Manson JE. Effects of vitamins C and E and β -carotene on the risk of type 2 diabetes in women at high risk of cardiovascular disease: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 429–437.
35. Viña J, Gambini J, López-Grueso R, Abdelaziz KM, Jove M, Borrás C. Females live longer than males: role of oxidative stress. *Curr Pharm Des* 2011; 17: 3959–3965.
36. Bast A, Haenen GRMM. Ten misconceptions about antioxidants. *Trends Pharmacol Sci* 2013; 34: 430–436.
37. Holt S. Hype around high-dose vitamin C is unjustified. *N Z Med J.* 2010; 123: 109–110.
38. Creagan ET, Moertel CG, O’Fallon JR, Schutt AJ, O’Connell MJ, Rubin J, Frytak S. Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patients with advanced cancer. A controlled trial. *N Engl J Med.* 1979; 301: 687–690.
39. Inoue K, Tsukamoto T, Sudo Y. Molecular and evolutionary aspects of microbial sensory rhodopsins. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1837: 562–577.
40. Mosca SM, Schinella GR, Tournier HA, Cingolani HE. Is the protection against ischemia induced by red wine linked to its antioxidant capacity?. *Exp Clin Cardiol* 2001; 6: 183–187.
41. Fantinelli JC, Schinella G, Cingolani HE, Mosca SM. Effects of different fractions of a red wine non-alcoholic extract on ischemia-reperfusion injury. *Life Sci* 2005; 76: 2721–2733.
42. Quideau S, Deffieux D, Pouységú L. Plant polyphenols: Resveratrol still has something to say about aging! *Angew Chem Int Ed* 2012, 51, 6824–6826.
43. Fraga CG. Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions. *IUBMB Life.* 2007; 59: 308–315.
44. Spencer JPE, Chaudry F, Pannala AS, Srai SK, Debnam E, Rice-Evans C. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272: 236–241.
45. Rios LY, Bennett RN, Lazarus SA, Rémyés C, Scalbert A, Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 1106–1110.
46. Williamson G. Bioavailability and health effects of cocoa polyphenols. *Inflammopharmacology* 2009; 17: 111.