

## Fenoles de interés farmacológico en hojas de vides silvestres (*Vitis* spp.) de México

[Phenols of pharmacological interest in leaves of wild grapevines (*Vitis* spp.) of Mexico]

J. Refugio TOBAR-REYES<sup>1,2</sup>, Omar FRANCO-MORA<sup>1\*</sup>,  
Edgar Jesús MORALES-ROSALES<sup>1</sup>, Juan Guillermo CRUZ-CASTILLO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Horticultura, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México; Toluca, México.  
<sup>2</sup>Escuela de Ingeniería Agrohídrica, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; Teziutlán, Puebla, México. <sup>3</sup>Centro Regional  
Universitario Oriente, Universidad Autónoma Chapingo; Huatusco, Veracruz, México.  
Contactos / Contacts: Omar FRANCO-MORA E-mail address [ofrancom@uaemex.mx](mailto:ofrancom@uaemex.mx)

---

### Abstract

Sedentary styles of life, along with inadequate nutritional habits, increase the risk to develop degenerative chronic diseases. Searching for possible alternatives of prevention for those risks, it has been investigated about the quality and nutraceutical properties of several agricultural commodities. The phenols are substances with important functions in vegetal organisms; and moreover they have antioxidants properties in the cellular metabolism of humans and animals. In order to quantify the content of three phenolic acids and a stilbene, it was performed analyses, by high performance liquid chromatography (HPLC-UV/Vis), on methanolic leaf extracts of 97 wild grapevines (*Vitis* spp.) of Puebla, Mexico. Those plants were found growing in their natural environments from 207 to 2175 m. The gallic acid was the most common of the metabolites since it appeared in 96 of the 97 samples, rutin was the second most common substance and it was identified in 80 samples, the caffeic acid appeared in 29 and finally resveratrol only in 14. The leaves of wild grapevines contain diverse antioxidants substances that might have several benefits in the human health; in addition the suitable conservation, maintenance and correct advantage of this plant genus provide environmental services and the balance of ecosystems.

**Keywords:** Caffeic acid, gallic acid, resveratrol, rutin

### Resumen

Estilos de vida sedentarios, conjugados con inadecuados hábitos alimenticios, incrementan el riesgo de contraer enfermedades crónicas degenerativas. En la búsqueda de posibles alternativas de prevención, se ha investigado en la calidad y aspectos nutraceuticos de productos agrícolas. Los fenoles son sustancias con importantes funciones en organismos vegetales que, además, poseen propiedades antioxidantes en el metabolismo celular de humanos y animales. Con objeto de cuantificar el contenido de tres ácidos fenólicos y un estilbeno, fueron realizados análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-UV/Vis) en extractos metanólicos de hojas provenientes de 97 accesiones de vides silvestres (*Vitis* spp.) de Puebla, México que crecían en su ambiente natural desde 207 hasta 2175 msnm. El ácido gálico fue el más común de los metabolitos ya que se presentó en 96 de las 97 muestras, el rutín fue la segunda sustancia en común y se identificó en 80 muestras; el ácido cafeico se presentó en 29 y finalmente el resveratrol en 14. Las hojas de vides silvestres poseen diversas sustancias antioxidantes que podrían tener múltiples beneficios en la salud humana; además la adecuada conservación, mantenimiento y aprovechamiento de este género provee servicios ambientales y el equilibrio de ecosistemas.

**Palabras Clave:** Ácido cafeico, ácido gálico, resveratrol, rutín.

---

**Recibido | Received:** 19 de Abril de 2010.

**Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form:** 21 de Febrero de 2011.

**Publicado en línea | Published online:** 30 de Marzo de 2011.

**Declaración de intereses | Declaration of interests:** A la Universidad Autónoma del Estado de México (Proyecto 2486/2007U, a cargo de OFM) y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el financiamiento parcial al presente trabajo. El sistema PROMEP-SEP, México, otorgó la beca para estudiar el doctorado a JRTR.

**Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as:** J. Refugio TOBAR-REYES, Omar FRANCO-MORA, Edgar Jesús MORALES-ROSALES, Juan Guillermo CRUZ-CASTILLO. 2011 Fenoles de interés farmacológico en hojas de vides silvestres (*Vitis* spp.) de México. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 10(2): 167 – 172.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.) es importante por su uso frutícola e industrial. La mayoría de las zonas productoras de uva cuentan con estrecha base genética, salvo algunas excepciones como en la Península Ibérica donde se cultivan 22 variedades autóctonas (Gago *et al.*, 2009). El reservorio genético para ampliar dicha base son las vides silvestres, mismas que se encuentran en riesgo de erosión genética por la deforestación producto de la acción antropogénica. En México se realizan trabajos de colecta de vides silvestres en los estados de Veracruz, Puebla y México (Franco-Mora *et al.*, 2008b; Cruz-Castillo *et al.*, 2009) para estudiar su uso potencial en vitivinicultura y se avanza en su caracterización bioquímica (Tobar-Reyes *et al.*, 2009). En este país, se ha informado sobre la pertinencia de evitar cambios de uso de suelo en áreas con recursos fitogenéticos, en particular de vid, con el fin de limitar la erosión genética de este género (Franco-Mora *et al.*, 2008a).

Los fenoles están presentes en los órganos de las plantas en diversas formas de estructuras químicas, constituyendo un grupo amplio de metabolitos secundarios que intervienen en diversas funciones biológicas (Menghinello, 1999). Los ácidos fenólicos naturales poseen acción como antioxidantes en sistemas vivos gracias a su capacidad para eliminar radicales libres (Parr y Bolwell, 2000; Akowuah *et al.*, 2004). Kulisic *et al.*, (2006) compararon el potencial antioxidante promedio obtenido con el ensayo de Rancimat de dos compuestos fenólicos sintéticos (5,52) contra el promedio (2,2) de tres infusiones acuosas ["orégano" (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*), "timo" (*Thymus vulgaris* L.) y "timo silvestre" (*Thymus serpyllum* L.)] y establecen que las infusiones con sustancias naturales son una buena fuente de antioxidantes.

El ácido gálico es importante por su acción anti cancerígena, aspecto ampliamente informado en la literatura (Choudhury *et al.*, 2007). Por otro lado, los principales hallazgos sobre la utilidad del ácido caféico señalan efectos importantes como anti-inflamatorio, anticancerígeno e inmunomodulador (Natarajan *et al.*, 1996; Song *et al.*, 2008). En relación al rutín, este destaca por ser un compuesto con acción venotónica (Cesarone *et al.*, 2005; Radwan *et al.*, 2008) y desinflamatoria (Selloum *et al.*, 2003; Cesarone *et al.*, 2008).

En cuanto al resveratrol (RVS) (estilbeno que se puede presentar en las formas *cis* y *trans*) en experimentos *in vitro* e *in vivo* mostró su potencial como inhibidor del inicio, promoción y desarrollo de

células cancerígenas (Jang *et al.*, 1997; Alkhalaf, 2007). En otros ensayos, RVS influyó incrementando la esperanza de vida en organismos como el pez *Nothobranchius furzeri* (Valenzano *et al.*, 2006), el nematodo *Caenorhabditis elegans* y la "mosca de la fruta" (*Drosophilla melanogaster* Meigen) (Wood *et al.*, 2004). En un ensayo previo, empleando una técnica específica para RVS, se determinó una amplia variabilidad [desde cantidades no detectadas hasta 39,5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  peso fresco (PF)] en el contenido de la sustancia para 18 accesiones de vides silvestres así como una marcada interacción del ambiente sobre el genotipo (Tobar-Reyes *et al.*, 2009).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar los contenidos de tres ácidos fenólicos y un estilbeno en hojas de vides silvestres, con una sola técnica de HPLC.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Zona de estudio y material vegetal utilizado

Las colectas se realizaron durante verano de 2009 en cinco municipios de la sierra norte de Puebla, México (Cuetzalan, Hueyapan, Teziutlán, Tlatlauquitepec y Zacapoaxtla) región donde se presenta bosque mesófilo secundario y selva perennifolia secundaria. El gradiente altitudinal donde se realizaron las colectas fue desde los 207 hasta los 2175 m. El clima que predomina en la región explorada es templado húmedo C (fm) y en las zonas con menor altitud el semicálido AC (fm) con lluvia todo el año; los andosoles y acrisoles son los tipos de suelo que predominan (Murillo, 2008; Franco-Mora *et al.*, 2008a). Se tomaron muestras de hojas sanas de vides silvestres a 97 plantas ubicadas y se geo-referenciaron con un GPS.

### Sustancias químicas

El ácido gálico, ácido caféico, rutín, resveratrol, metanol, tetrahidrofurano y ácido ortofosfórico fueron adquiridos de SIGMA-Aldrich; excepto el último, todos con grado HPLC. Se usó agua bidestilada (filtrada dos veces con membrana pvdf de 0,45  $\mu\text{m}$ ).

### Muestreo vegetal y extracción

De cada planta fueron elegidas tres ramas y de cada una se pesaron 10 g de hojas frescas sin pecíolo con una balanza electrónica portátil (0,1 g de sensibilidad y 260 g de capacidad máxima). Después las hojas se enrollaron, se colocaron dentro de una bolsa de papel bond y transcurridos de 100 a 120 min se cortaron con tijeras de acero inoxidable en fragmentos de 2  $\text{cm}^2$  aproximadamente. Posteriormente se colocaron en

frascos de polietilentereftalato y se agregaron 200 ml de metanol, se mantuvieron a temperatura de laboratorio ( $20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ) durante 10 días para inducir la hidrólisis. Pasado el período de extracción, se maceró en mortero, se colocó durante una hora en un agitador rotatorio digital (Bigger Bill, Thermolyne) a 100 rpm protegidas de la luz. Después se coló con cernidor de polietileno y se filtró con papel Whatman No. 5. De cada extracto se tomaron 2 ml y se formó una muestra compuesta (6 ml) que se centrifugó a 3700 rpm durante 15 min. Finalmente, el sobrenadante se pasó a través de acrodiscos de membrana pvdf de  $0,45 \mu\text{m}$  (Pall Sciences). La muestra resultante se mantuvo a  $0^{\circ}\text{C}$  en viales ámbar de 2 ml antes de ser inyectado al HPLC.

### Separación de fenoles

La separación de los cuatro analitos bajo estudio se realizó simultáneamente en un HPLC serie 200 Perkin Elmer (USA) equipado con un detector ultravioleta-visible (UV/Vis), bomba binaria, degasificador e inyector manual. Las muestras fueron analizadas a temperatura de laboratorio ( $23^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Se usó una columna Mightysil fase reversa C18,  $5 \mu\text{m}$  diámetro interno,  $250 \times 4,6 \text{ mm}$  (Japón). El método cromatográfico empleado consideró como fase móvil dos soluciones bajo régimen isocrático (Akowuah *et al.*, 2004), la solución uno fue agua bidestilada ajustada a pH 3 con ácido ortofosfórico y la solución dos una mezcla de metanol:tetrahidrofurano (90:10; v/v). Se inyectaron manualmente  $20 \mu\text{L}$  (estándares y

muestras de extractos) permitiendo  $0,5 \text{ min}$  para el vaciado del anillo muestreador ( $30 \mu\text{L}$ ), cada corrida tuvo una duración de  $42 \text{ min}$  con flujo constante de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Para la validación del método se construyeron curvas de calibración a cada uno de los cuatro estándares de referencia con cuatro diluciones sucesivas en metanol; los coeficientes de determinación obtenidos fueron 0,998, 0,999, 0,998 y 0,994 respectivamente. Los tiempos de retención para cada estándar fueron 6,07, 8,25, 10,02 y 13,27 min. El detector permaneció a una longitud de onda de 280 nm. El software TotalChrom Workstation versión 6,2 d, identificó y calculó por el método de estándar externo las cantidades presentes en las muestras para cada analito; mediante esta aplicación también se tuvo control del equipo así como el manejo de los archivos generados.

### Análisis estadístico

Se practicó análisis de varianza para cada uno de los analitos estudiados, tomando únicamente aquellas accesiones donde hubo separación del compuesto. A los promedios de cada fenol se practicó un análisis de regresión lineal simple. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones y cada repetición provino de tres muestras de hojas frescas.

### RESULTADOS

En el presente trabajo, se destaca las diferencias estadísticas dentro de accesiones para los cuatro analitos estudiados (Tablas 1 y 2).

**Tabla 1.** Cuadrados medios y nivel de significancia para el contenido de tres ácidos fenólicos en hojas de vides silvestres del estado de Puebla, México, 2009.

Fuente	Ácido gálico		Ácido caféico		Rutín	
	g. l.		g. l.		g. l.	
Accesión	95	866,6 *	28	0,1251 *	79	569,4 *
Repetición	2	135,6 *	2	0,0002	2	27,1
Error	190	24,7	56	0,0002	158	35,1
C. V.		14,6		34,3		52,0

\*: Significativo con una probabilidad  $P < 0,05$ .

**Tabla 2.** Cuadrados medios y nivel de significancia para el contenido de resveratrol en hojas de vides silvestres del estado de Puebla, México, 2009.

Fuente	g. l.	
Accesión	13	$1,3 \text{ E}^{-5} *$
Repetición	2	$7,0 \text{ E}^{-8}$
Error	26	$1,3 \text{ E}^{-7}$
C. V.		31,0

El ácido gálico fue el compuesto con mayor número de casos positivos, 96 accesiones, y el de mayor contenido (Tabla 3); en el otro extremo quedó el resveratrol con sólo 14 casos positivos y los contenidos más bajos en relación a los tres ácidos fenólicos (Tabla 4).

**Tabla 3.** Localización de las accesiones de vides silvestres con mayor contenido de compuestos fenólicos, Puebla, México, 2009.

	Contenido (mg.g <sup>-1</sup> P.F.)	Altitud (m)	Municipio
Ácido gálico	88,100	1563	Tlatlauquitepec
Ácido caféico	1,110	1720	Cuetzalan
Rutín	68,900	1687	Cuetzalan
Resveratrol	0,006	1759	Cuetzalan

**Tabla 4.** Localización de las accesiones de vides silvestres con menor contenido de cuatro compuestos fenólicos, Puebla, México, 2009.

	Contenido (mg.g <sup>-1</sup> P.F.)	Altitud (m)	Municipio
Ácido gálico	0,40000	1720	Cuetzalan
Ácido caféico	0,00002	1589	Hueyapan
Rutín	0,00700	1568	Tlatlauquitepec
Resveratrol	0,00002	1622	Teziutlán

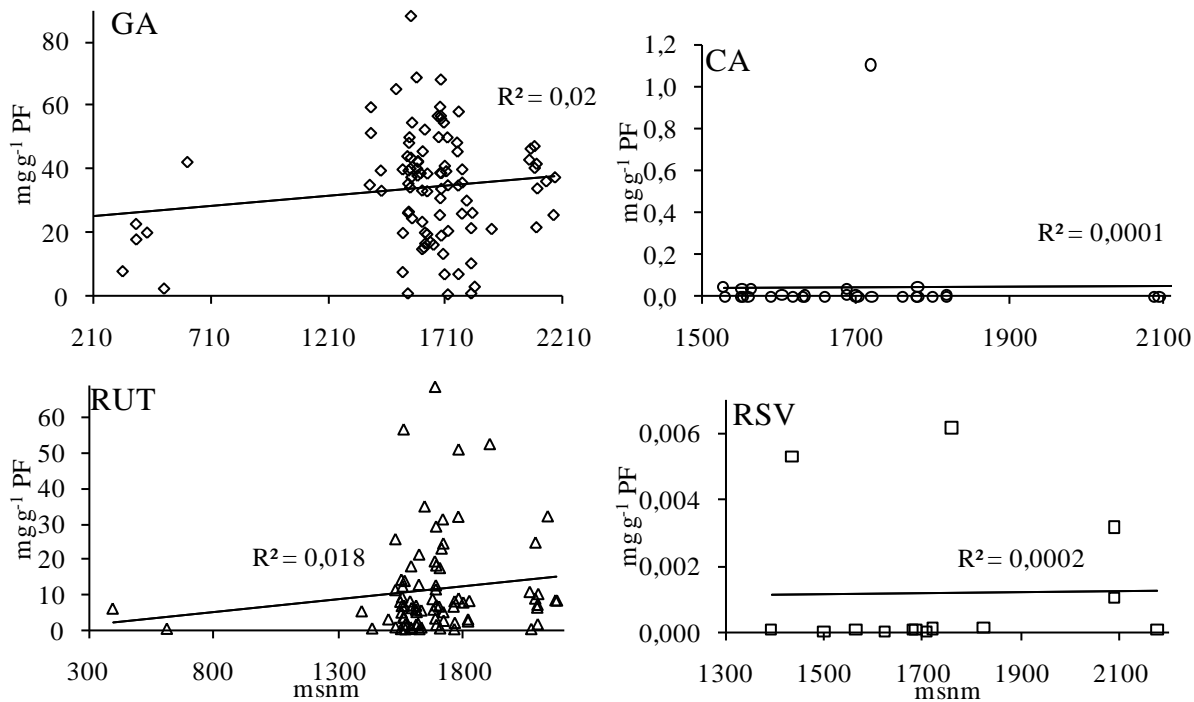
De las 97 accesiones analizadas, 12 contienen un analito, 49 contienen dos, 35 contienen tres y la accesión 53 colectada a 2089 msnm en el municipio de Zacapoaxtla contiene los cuatro analitos; la dispersión de los contenidos de los analitos estudiados a través del gradiente altitudinal se presenta en la Figura 1.

**DISCUSIÓN**

El presente experimento muestra que mediante HPLC-UV/Vis, en una corrida simple es posible separar e

identificar cuatro compuestos fenólicos a partir de hojas de vides silvestres en extracción metanólica. Las plantas analizadas exhiben diferencias en relación al tipo de compuesto fenólico así como a la concentración de este, ello se encuentra probablemente influenciado por el ambiente (Tobar-Reyes *et al.*, 2009) además de la calidad de la planta y de las condiciones geográficas (Franco-Mora *et al.*, 2008a,b); los resultados (Figura 1) sugieren independencia del contenido de fenoles en relación a la altitud.

**Figura 1.** Regresión lineal de contenido de cuatro analitos en hojas de vid silvestre en relación a la altitud (m) de ubicación. Ácido gálico (GA), ácido caféico (CA), rutín (RUT) y resveratrol (RSV).



### Ácido gálico

Los resultados muestran al ácido gálico como el principal compuesto presente, lo mismo ocurre en infusiones de té negro (*Camellia sinensis* L.) de 25 diferentes marcas comerciales (Tokusoglu *et al.*, 2008). En vino se reporta 0,003 mg.ml<sup>-1</sup> de ácido gálico, en jugo de "cereza" (*Cerasus vulgare* Mill.) 0,009 mg.ml<sup>-1</sup>, en "tomate" (*Solanum lycopersicum* L.) 0,001 mg.g<sup>-1</sup> PF y en frutos de "rosa" (*Rosa canina* L.) 0,023 mg.g<sup>-1</sup> PF (Ozturk *et al.*, 2007); todos los resultados anteriores son inferiores en relación a los del presente estudio.

### Ácido caféico

El té negro contiene 2,8 mg.g<sup>-1</sup> peso seco (PS) de ácido caféico, en frutos de "rosa" hay 0,03 mg.g<sup>-1</sup> PF y en "tomate" 0,002 mg.g<sup>-1</sup> PF (Ozturk *et al.*, 2007). Entonces, en las vides silvestres estudiadas hay mayor contenido para este ácido que en frutos de "rosa" y "tomate" puesto que el mayor promedio fue 1,10 mg.g<sup>-1</sup> PF. En *Geranium sanguineum* reportan 2,41 mg.g<sup>-1</sup> PS (Leucuta *et al.*, 2005) mientras que en otro experimento, Caniova y Brandsteterova (2001) obtienen 1,91 mg.g<sup>-1</sup> PS en *Melissa officinalis*.

### Rutín

Se determinaron 68,9 mg.g<sup>-1</sup> PF como máximo, valor que puede ser comparable con 1,71 mg.g<sup>-1</sup> PS obtenido por Leucuta *et al.* (2005) en *Geranium sanguineum* e incluso con 27,5 mg.g<sup>-1</sup> PS que fue detectado en hojas de amaranto (*Amaranthus* spp.) por Kalinova y Dadakova (2009).

### Resveratrol

En un estudio previo realizado en vides silvestres creciendo bajo diferentes condiciones ambientales se obtuvo un contenido máximo igual a 39,51 µg RVS.g<sup>-1</sup> PF (Tobar-Reyes *et al.*, 2009). Sin embargo, en el presente experimento se registró un valor máximo de 6 µg.g<sup>-1</sup> PF debido probablemente a que la metodología de extracción usada no es específica para RSV, a lo anterior se puede adicionar el hecho de que las plantas presentaban buena sanidad, condición en la cual se reprime la síntesis del estilbeno.

### CONCLUSIONES

Con base en los resultados mostrados, se infiere el potencial farmacológico de las vides silvestres; recurso empleado en México desde tiempos antiguos en algunos de los sitios de colecta. Por ello, la conservación y el establecimiento de vides silvestres

para el aprovechamiento de fenoles y otros productos en su hábitat natural, generalmente bosques, traspatios, o bien a la par de plantaciones forestales, podría ser una alternativa económica y ecológicamente viable.

### AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de México (Proyecto 2486/2007U, a cargo de OFM) y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el financiamiento parcial al presente trabajo. El sistema PROMEP-SEP, México, otorgó la beca para estudiar el doctorado a JRTR.

### REFERENCIAS

- Akouwah GA, Zhari I, Norhayati I, Sadikun A. 2004. Radical scavenging activity of methanol leaf extracts of *Orthosiphon stamineus*. *Pharm Biol* 42: 629 - 635.
- Alkhalaf M. 2007. Resveratrol-induced apoptosis is associated with activation of p53 and inhibition of protein translation in T47D human breast cancer cells. *Pharmacol* 80: 134 - 143.
- Caniova A, Brandsteterova E. 2001. HPLC analysis of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *J Liq Chromatogr Rel Technol* 24: 2647 - 2659.
- Cesarone MR, Belcaro G, Grossi MG. 2008. O-(P-Hydroxyethyl)-Rutosides (Paroven; Venoruton): New studies, improved safety, and novel cardiovascular applications. *Angiology* 59: 5s - 6s.
- Cesarone MR, Belcaro G, Pellegrini L, Vinciguerra G, Ricci A, Gizzi G, Ippolito E, Fano F, Dugall M, Acerbi G, Cacchio M, Di Renzo A, Stuard S, Corsi M. 2005. HR, O-CBeta-Hydroxyethyl-Rutosides; (Venoruton®): rapid relief of signs/symptoms in chronic venous insufficiency and microangiopathy: a prospective, controlled study. *Angiology* 56: 165 - 172.
- Choudhury RP, Kumar A, Garg AR. 2007. Elemental characterization of trifala powders and tablets by instrumental neutron activation analysis, thermal analysis and spectral studies of gallic acid. *J Herbal Pharmacother* 7: 15 - 29.
- Cruz-Castillo JG, Franco-Mora O, Famiani F. 2009. Presence and uses of wild grapevine (*Vitis* spp.) in the central region of Veracruz in Mexico. *J Int Sc Vigne Vin* 43: 77 - 81.
- Franco-Mora O, Cruz-Castillo JG, Cortés-Sánchez AA, Rodríguez-Landero AC. 2008a.

- Localización y usos de vides silvestres (*Vitis* spp.) en el estado de Puebla, México. *Ra Ximhai* 4: 151 - 165.
- Franco-Mora O, Morales-Rosales EJ, González-Huerta A, Cruz-Castillo JG. 2008b. Vegetative characterization of wild grapevines (*Vitis* spp.) native to Puebla, Mexico. *HortScience* 43: 1991 - 1995.
- Gago P, Santiago JL, Boso S, Alonso-Villaverde V, Stella M, Martínez MC. 2009. Biodiversity and characterization of twenty-two *Vitis vinifera* L. cultivars in the northwestern Iberian Peninsula. *Am J Enol Vit* 60: 293 - 301.
- Jang M, Cai L, Udeani G, Slowing K, Thomas C, Beecher C, Fong H, Farnsworth N, Kinghorn D, Metha R, Moon R, Pezzuto J. 1997. Cancer, chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218 - 220.
- Kalinova J, Dadakova E. 2009. Rutin and total quercetin content in amaranth (*Amaranthus* spp.). *Plant Foods Hum Nutr* 64: 68 - 74.
- Kulisic T, Dragovic-Uzelac V, Milos M. 2006. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. *Food Technol Biotechnol* 44: 485 - 492.
- Leucuta S, Vlase L, Gokan S, Radu L, Fodorea C. 2005. Determination of phenolic compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC. *J Liq Chromatogr Rel Tech* 28: 3109 - 3117.
- Menghinello P, Cucchiari L, Palma F, Agostini D, Dachá M, Stocchi V. 1999. Simultaneous analysis of flavonoid aglycones in natural products using an RP-HPLC method. *J Liq Chromatogr Rel Tech* 22: 3007 - 3018.
- Murillo LD. 2008. Pueblos indígenas de México y agua: nahuas de la región nororiental de Puebla. Instituto Mexicano de Tecnología el Agua. Consultado 6 abr. 2010. Disponible en: [www.unesco.org/uy/phi/aguaycultura/es/paise/mexico/pueblo-nahuas-de-la-sierra-norte-de-puebla.html](http://www.unesco.org/uy/phi/aguaycultura/es/paise/mexico/pueblo-nahuas-de-la-sierra-norte-de-puebla.html)
- Natarajan K, Singh S, Burke TR, Grunberger D, Aggarwal BB. 1996. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9090 - 9095.
- Ozturk N, Tuncel M, Tuncel NB. 2007. Determination of phenolic acids by a modified HPLC: its application to various plant materials. *J Liq Chromatogr Rel Tech* 30: 587 - 596.
- Parr AJ, Bolwell GP. 2000. Phenols in plants and in man: The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenol content or profile. *J Sci Food Agric* 80: 985 - 1012.
- Radwan RR, Shaban EA, Kenawy SA. 2008. Hepatoprotective efficiency of combined administration of natural antioxidants (rutin and vitamin E) and cysteine in hyperthermic irradiated rats. *Egypt J Hosp Med* 32: 441 - 454.
- Selloum L, Bouriche H, Tigrine C, Boudoukha C. 2003. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp Toxicol Pathol* 54: 313 - 318.
- Song JJ, Cho J, Hwang S, Cho CG, Park SW, Chae SW. 2008. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on LPS-induced inflammation of human middle ear epithelial cells. *Acta Oto-Laryngologica* 128: 1303 - 1307.
- Tobar-Reyes JR, Franco-Mora O, Cruz-Castillo JG, Morales-Rosales EJ. 2009. Resveratrol content in leaves of Mexican wild grapevines (*Vitis* spp.). *Rev FCA UNCuyo* 41: 127 - 137.
- Tokusoglu O, Ünal MK, Balaban MÖ. 2008. Catechins and methylxanthines in twenty-three black tea infusions by HPLC: correlations with astringency. *Ital J Food Sci* 20: 479 - 492.
- Valenzano D, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A. 2006. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol* 16: 296 - 300.
- Wood J, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand S, Tatar M, Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430: 668 - 689.