

INHIBICIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y CAPACIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES DE ALCALOIDES AISLADOS DE DOS ANNONACEAE, *Xylopia amazonica* cf. Y *Duguetia vallicola*

INHIBITION OF THE LIPID PEROXIDATION AND FREE RADICAL SCAVENGING CAPACITY OF ALKALOIDS ISOLATED FROM TWO ANNONACEAE, *Xylopia amazonica* cf. AND *Duguetia vallicola*

Orlando Arango¹, Edwin Pérez¹, Hillmer Granados¹, Benjamín Rojano^{1,2}, Jairo Sáez^{1,3}

Resumen

El alcaloide aislado de las hojas de *Duguetia vallicola*: N-metil laurotetanina **1** y sus derivados O-metilado **2**, O-acetilado **3**, conjuntamente con los alcaloides aislados de la corteza de *Xylopia amazonica* cf.: dicentrinona **4** y liriodenina **5** fueron evaluados frente a dos modelos antioxidantes: una peroxidación lipídica en un sistema emulsificado metil linoleato/ β -caroteno y la capacidad atrapadora del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). La N-metil laurotetanina presentó una moderada capacidad atrapadora de radicales libres DPPH con un IC_{50} de 90,6 μ M, comparada con el antioxidante comercial de mayor uso, butil hidroxianisol (BHA) (IC_{50} = 44,4 μ M). Los alcaloides dicentrinona, N-metil laurotetanina y sus derivados O-metilado, O-acetilado presentaron una buena actividad antiperoxidativa frente al modelo metil linoleato/ β -caroteno, presumiblemente por su habilidad de extinguir el oxígeno singlete.

Palabras clave: alcaloides isoquinolínicos, DPPH, oxígeno singlete, oxoaporfina, peroxidación lipídica.

Abstract

The alkaloid isolated from *Duguetia vallicola* leaves: N-methyl laurotetanine **1** and its derived, O-methylated **2**, O-acetylated **3**, in addition to the alkaloids isolated from *Xylopia amazonica* cf. stem bark: dicentrinone **4** and liriodenine **5** were tested using two antioxidant models: a lipid peroxidation in an emulsified system of methyl linoleate/ β -carotene and the free radical scavenger activity of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH). N-methyl laurotetanine showed a moderate scavenger activity (DPPH) with an IC_{50} of 90.6 μ M compared to the most commonly used commercial antioxidant, butyl hydroxyanisole (BHA) (IC_{50} = 44.4 μ M). The alkaloids dicentrinone, N-methyl laurotetanine and their derived, O-methylated, O-acetylated, showed a good antiperoxidative activity against the methyl linoleate/ β -carotene system probably due to the quenching single oxygen activity.

Key words: alkaloids, DPPH, isoquinoline, lipid peroxidation, oxoaporphines, single oxygen.

INTRODUCCIÓN

El creciente uso de antioxidantes en el campo de los alimentos, la industria y la medicina hace necesario una búsqueda de nuevos compuestos tanto en el campo de la síntesis como de los productos naturales.

Las evidencias recientes sobre el daño oxidativo que los radicales libres producen en las células generando problemas de tipo cardiovascular, inflamaciones y otras enfermedades relacionadas con el envejecimiento, han

despertado el interés sobre el uso de compuestos que neutralicen estos radicales (Kerem *et al.*, 2003; Kwiek *et al.*, 2004).

Además de los compuestos de tipo fenólico, existen metabolitos nitrogenados que son inhibidores de varios procesos oxidativos tanto in vitro como in vivo (Basu *et al.*, 1999). Se puede esperar que el átomo de nitrógeno confiera a las moléculas propiedades nucleofílicas (donante de electrones) y potencialmente antioxidantes, basado en los bajos potenciales de

Recibido: junio de 2003; aceptado para publicación: julio de 2004.

¹ Grupo de Química de Plantas Colombianas, Instituto de Química, Universidad de Antioquia. A. A. 1226, Medellín (Antioquia), Colombia.

² Escuela de Química, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. A. A. 3840, Medellín (Antioquia), Colombia.

³ Correspondencia a: <jaisav@matematicas.udea.edu.co>.

ionización y redox. Las aminas actúan como donantes de electrones e hidruros en radicales libres tales como hidroxilo (HO•), peroxilo (ROO•), y radical alquilo (R•) (Basu et al., 1999).

Los alcaloides desempeñan un papel antioxidante como extinguidores de oxígeno singlete. En el caso específico de los alcaloides isoquinolínicos la literatura reporta una gran inhibición de la peroxidación lipídica de bisbenzilisoquinolinas (Kougure et al., 1999; Larson, 1988), actividad antifotooxidativa de protoberberinas (Kim et al., 2000) y antioxidantes de tipo aporfinoideos (Misik et al., 1995).

El presente trabajo estudia la actividad antioxidante in vitro de tres alcaloides naturales, la aporfina *sensu stricto* N-metil laurotetanina 1 aislada de hojas de *D. vallicola*, sus derivados O-metilado 2 y O-acetilado 3, y dos oxoaporfinas dicentrinona 4, lirioidenina 5 aisladas de la corteza de *X. amazonica* cf. (figura 1), frente a la inhibición de la peroxidación del metil linoleato y la capacidad para atrapar el radical libre DPPH.

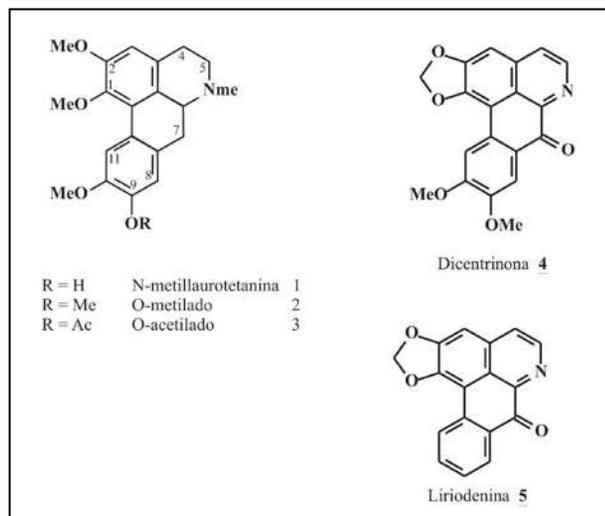


Figura 1. Estructura de alcaloides utilizados en este estudio: N-metil laurotetanina 1, y sus derivados O-metilado 2 y O-acetilado 3, dicentrinona 4, lirioidenina 5

MATERIALES Y MÉTODOS

Los espectros UV se obtuvieron en MeOH utilizando un espectrofotómetro Génesis 2 (ThermoSpectronic), los espectros IR se realizaron en un Perkin-Elmer RXI (FT-IR), para la realización de

los espectros de ¹H RMN (300 y 400 MHz) y ¹³C RMN (75 y 100 MHz) se utilizó un Bruker AMX 300 y Bruker AM400.

Material vegetal. Las hojas de *D. vallicola* y la corteza de *X. amazonica* cf. se colectaron en el municipio de Montería (Córdoba). Los ejemplares se encuentran depositados en el Herbario del Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe, Medellín, bajo los números de colección JAUM 37841 y 37851 respectivamente.

Reactivos y solventes. El radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), el butil hidroxianisol (BHA) y el β-caroteno, fueron obtenidos de Aldrich Chem. Co. (Millw, WI); Tween 20 y el hydrogenofosfato de sodio anhídrido fueron comprados a Merck (Darmstadt, Germany). Todos los solventes fueron bidestilados.

Análisis estadístico. Los experimentos fueron repetidos tres veces para cada concentración. Para todas las regresiones con un nivel de significancia p < 0,05, se usó el programa STATGRAPHICS Plus, versión 5.0 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD). El IC₅₀ es la concentración del compuesto que inhibe el 50% de β-caroteno o DPPH utilizado en los experimentos.

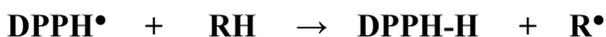
Extracción y aislamiento. Las hojas secas y molidas de *D. vallicola* (1.500 g), se desengrasaron con éter de petróleo por percolación, el marco desengrasado se humectó con solución de hidróxido de amonio (NH₄OH) al 5%, y luego se extrajo por percolación a temperatura ambiente con diclorometano hasta agotamiento. La solución de diclorometano se concentró a presión reducida a un volumen de 500 ml y sometió a partición con ácido clorhídrico al 3%, la fase acuosa ácida se filtró y alcalinizó con hidróxido de amonio hasta pH 8-9 y posteriormente los alcaloides base se extrajeron con diclorometano. La solución orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró a presión reducida obteniéndose un residuo de alcaloides totales (A. T.) de 7,5 g.

La separación de los alcaloides se realizó por cromatografía en columna, eluyendo con mezclas de diclorometano: metanol: amoníaco (30:1:0,1), permitiendo el aislamiento del alcaloide 1 (780 mg).

Los derivados O-metilado 2 y O-acetilado 3, se prepararon por la adición de diazometano en éter y anhídrido acético en piridina respectivamente.

La extracción de los alcaloides de la corteza seca y molida (3.400 g) de la especie *Xylopiya amazonica* cf. se realizó por el método clásico mencionado anteriormente para la obtención de 9,5 g de A. T. (0,28%). Con el fin de separar los alcaloides principales que por monitoreo mostraban las placas de cromatografía en capa fina (TLC) reveladas con el reactivo de Dragendorff, los 9,5 g de alcaloides totales (A. T.), se sometieron a fraccionamiento por cromatografía en columna, utilizando silica gel como fase estacionaria y eluyendo con una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH (9:0,6). Se recogieron 60 fracciones, y en las fracciones más representativas [18-22] (0,780 g) y [23-34] (1,10 g) se encontraron dos alcaloides mayoritarios que por cromatografías en columna sucesivas y utilizando como eluyente tolueno/dietilamina/MeOH (7:3:0,05), se obtuvieron los alcaloides 4 (150 mg) y 5 (180 mg).

Actividad atrapadora del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). La actividad atrapadora de radicales libres contra el radical estable DPPH fue medida usando el método de Brand-Williams *et al.* (1995) con menores modificaciones. El método se fundamenta en la decoloración que sufre el radical libre estable (DPPH) al pasar de su forma oxidada a la reducida en presencia de un antioxidante u otro radical.



La capacidad de decoloración del DPPH, se relaciona directamente con la actividad que tienen los compuestos o extractos para atrapar radicales libres.

Para evaluar la actividad antioxidante se utilizó una solución de DPPH de 20 mg/l y el butil hidroxianisol (BHA) se utilizó compuesto de referencia a diferentes concentraciones, estos se mezclaron en una relación final de volumen 2:1. Las soluciones de DPPH se prepararon en el momento de su uso y se mantuvieron a 4 °C entre las mediciones. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 517 nm y la capacidad

atrapadora (decoloración) del radical se determinó mediante la ecuación:

$$CD = \left[1 - \frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco muestra})}{\text{Abs referencia}} \right] \times 100$$

CD: Capacidad de decoloración.

Abs: Absorbancia.

Los valores de IC_{50} , que denotan la concentración del compuesto requerida para atrapar el 50% del radical libre DPPH, se calcularon por regresión lineal, donde la abscisa representa la concentración de las muestras y la ordenada la capacidad de decoloración.

Autoxidación en el sistema β -caroteno/metil linoleato. El ensayo de peroxidación lipídica en el sistema micelar metil linoleato/ β -caroteno es más complejo, porque éste mide tres propiedades antioxidantes de la muestra, la capacidad para extinguir oxígeno singlete 1O_2 a oxígeno triplete 3O_2 , atrapamiento de radicales peroxilos y además la orientación del compuesto en el sistema micelar. Estos mecanismos se pueden explicar teniendo en cuenta las etapas que ocurren en el proceso de autoxidación de ácidos grasos insaturados (figura 2). En las reacciones de autoxidación se puede apreciar que el antioxidante puede atrapar radicales peroxilos en la etapa de propagación inhibiendo la continuidad de la reacción en cadena. En el caso del cambio de multiplicidad del oxígeno singlete (1O_2) a oxígeno triplete 3O_2 se inhibe la etapa de iniciación porque el oxígeno triplete 3O_2 es mil veces menos reactivo. La tercera propiedad antioxidante que mide el método en el sistema micelar metil linoleato/ β -

Iniciación	$\text{R-H} \rightarrow \text{R}^{\bullet} + \text{H}^{\bullet}$
Propagación	$\text{R}^{\bullet} + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROO}^{\bullet}$
	$\text{ROO}^{\bullet} + \text{R-H} \rightarrow \text{R}^{\bullet} + \text{ROOH}$
Terminación	$\text{R}^{\bullet} + \text{R}^{\bullet}$
	$\text{R}^{\bullet} + \text{ROO}^{\bullet} \rightarrow \text{Productos no radicalarios}$
	$\text{ROO}^{\bullet} + \text{ROO}^{\bullet}$

Figura 2. Mecanismo general de la autoxidación de ácidos grasos

caroteno, está dirigido al carácter lipofílico-hidrofílico de la molécula que se va a evaluar, de manera que la ubicación del compuesto en la micela podría permitir la interacción más frecuente con posibles especies radicalarias que se formen durante la oxidación del ácido graso (Kougure et al., 1999; Zhou et al., 2000).

Para evaluar los compuestos se tomaron 20 mg de β-caroteno, se disolvieron en 0,5 ml de cloroformo y se llevaron a 10 ml con éter de petróleo, en un balón volumétrico forrado con papel aluminio. Se tomaron 0,46 ml de solución de β-caroteno, se adicionaron 200 µl de Tween 20 y 13,5 µl de metil linoleato. Se homogeneizó la solución y se secó en atmósfera de nitrógeno. A la mezcla seca se le agregaron 50 ml de buffer fosfato de pH 7,4 y se aforó con agua destilada en un balón volumétrico de 100 ml. Se burbujeó con oxígeno por 90 s y se incubó con la solución de la muestra a 50 °C por 1 hora. El grado de oxidación se midió por la diferencia de absorbancia a 455 nm en el sistema, antes y después de la incubación (Marco et al., 1968; Antolovich et al., 2002; Valentao et al., 2002).

RESULTADOS

El alcaloide N-metil laurotetanina 1 fue el mejor atrapador del radical DPPH con un IC₅₀ de 90,6 µM, dos veces menor que la actividad del butil hidroxianisol (IC₅₀ = 44,4 µM), que es el antioxidante sintético de mayor uso en la industria alimenticia (tabla 1). Cuando se metila o acetila el grupo hidroxilo ubicado en la posición 9 del alcaloide 1 se reduce notablemente la actividad atrapadora de radicales (IC₅₀ < 150 µM derivado metilado e IC₅₀ = 180 µM derivado acetilado). La capacidad atrapadora de la N-metil laurotetanina

se debe a la transferencia del H en el OH del C-9 y la subsiguiente estabilización debido a la formación de un grupo carbonilo sobre ese carbono, al unirse un electrón del doble enlace de la posición 8-9 con el radical ubicado sobre el oxígeno, formándose un nuevo radical en la posición 8; el reordenamiento posterior forma un doble enlace en la posición 7a-8 y origina el radical en la posición 11a, éste a su vez se enlaza con uno de los electrones del doble enlace en 11a-1a; finalmente se libera otro radical H• proveniente del hidrógeno de la posición 6a y se produce un acoplamiento oxidativo entre los radicales para formar un doble enlace en la posición 1b-6a (figura 3), (Cassels et al., 1995; Martínez et al., 1992; Pérez, 2003). La dicentrinona 4 y la lirioidenina 5 poseen poca actividad atrapadora del radical DPPH, debido a la carencia de H activos (IC₅₀ > 150 µM en ambos casos).

En el caso de la decoloración de la emulsión metil linoleato/β-caroteno se encontró que el alcaloide oxoaporfínico dicentrinona posee una buena actividad antiperoxidativa con un IC₅₀ de 57,9 µM ; este compuesto no tenía actividad atrapadora del radical DPPH, por lo cual debe tener poca actividad para atrapar los radicales peroxilos generados en la autooxidación del metil linoleato; su buena actividad en este sistema puede deberse a que el alcaloide dicentrinona 4 actúa sobre el ¹O₂ pasándolo a su forma más estable de oxígeno triplete (³O₂), retardando la etapa de iniciación de la oxidación del metil linoleato. Estos resultados se asemejan y complementan los trabajos de Kim et al. (2000).

Los alcaloides N-metil laurotetanina y sus derivados O-metilado, O-cetilado presentaron un IC₅₀ de 47,2,

Tabla 1. Valores de IC₅₀ de los alcaloides aislados frente a los modelos DPPH y peroxidación lipídica (metil linoleato/β-caroteno). (N. D.: no determinado)

Alcaloide	Método	DPPH IC50 (µM)	Peroxidación lipídica IC50 (µM) (metil linoleato/β-caroteno)
N-metil laurotetanina <u>1</u>		90,6	47,2
O-metilado <u>2</u>		> 150,0	57,5
O-acetilado <u>3</u>		188,0	58,0
Dicentrinona <u>4</u>		> 150,0	57,9
Lirioidenina <u>5</u>		> 150,0	N.D.
BHA		44,4	11,1

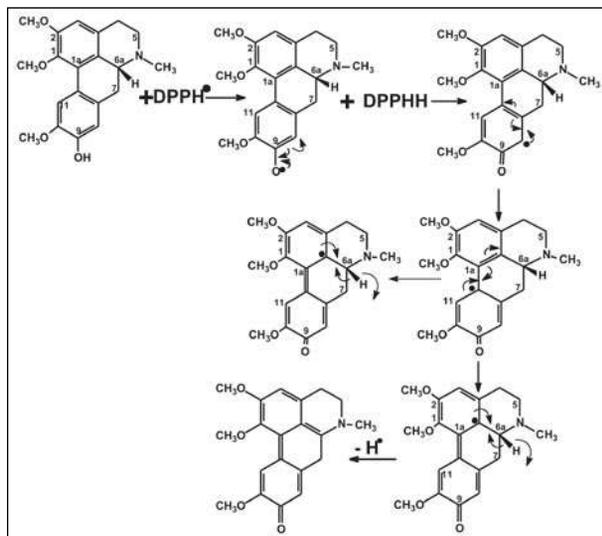


Figura 3. Mecanismo general para atrapar radicales libres de alcaloides isoquinolínicos

57,5, 58,2 μM respectivamente en el modelo metil linoleato/ β -caroteno, significando la capacidad dual de estos alcaloides para atrapar radicales peroxilos y a la vez extinguir el oxígeno singlete.

Las estructuras de los alcaloides 1, 2, 3, 4, y 5 se elucidaron por métodos espectroscópicos de RMN ^1H y RMN ^{13}C , mono y bidimensionales, IR, UV y por comparación con los datos reportados en la literatura.

N-metil laurotetanina 1 (Guinaudeau et al., 1979): UV (MeOH) λ_{max} (nm): 304, 280, 217. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ 8,06 (1H, s, H-11), 6,80 (1H, s, H-8), 6,59 (1H, s, H-3), 3,89 (6H, s, OMe-2,10), 3,66 (3H, s, OMe-1), 2,51 (3H, s, NMe-6).

Derivado *O*-metilado 2 (Guinaudeau et al., 1975): ^1H RMN, δ 6,63 (1H, s, H-3), 6,89 (1H, s, H-8), 8,21 (1H, s, H-11), 3,72 (3H, s, OMe-1), 3,93 (3H, s, OMe-2), 3,97 (6H, s, OMe-9,10).

Derivado *O*-acetilado 3: ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ 8,16 (1H, s, H-11), 6,95 (1H, s, H-8), 6,64 (1H, s, H-3), 2,64 (3H, s, NMe), 2,33 (3H, s, -COMe).

Dicentrinona 4 (Guinaudeau et al., 1975): IR (KBr, v cm^{-1}): 1645, 1604, 1466, 1242, 1036. U.V. (λ_{max} , nm): 223,0 (3.880), 274,0 (2.905), 358,0 (0,705). ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 6,07 (2H, s,

OCH₂O-1, 2), 7,12 (1H, s, H-3), 7,70 (1H, d, $J = 5,3$ Hz, H-4), 8,82 (1H, d, $J = 5,3$ Hz, H-5), 7,94 (1H, s, H-8), 8,61 (1H, s, H-11), 4,02 (3H, s, OMe-9), 3,94 (3H, s, OMe-10).

Liriodenina 5 (Guinaudeau et al., 1975): IR (KBr, v cm^{-1}): 1621, 1443, 1250, 1028, 920. U.V. (λ_{max} , nm): 214,0 (2.860), 247,0 (3.061), 268,0 (2.525), 309,0 (0,805). ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 6,37 (2H, s, OCH₂O-1, 2), 7,19 (1H, s, H-3), 7,77 (1H, d, $J = 5,1$ Hz, H-4), 8,89 (1H, d, $J = 4,9$ Hz, H-5), 8,86 (1H, dd, $J = 7,8, 1,4$ Hz, H-8), 7,58 (1H, t, $J = 7,6$ Hz, H-9), 7,75 (1H, td, $J = 7,7, 1,4$ Hz, H-10), 8,65 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-11).

DISCUSIÓN

El alcaloide dicentrinona 4 aislado de la corteza de *X. amazonica* cf., junto con la *N*-metil laurotetanina 1 aislado de las hojas de *D. vallicola* y sus derivados *O*-metilado 2, *O*-acetilado 3, presentaron una buena actividad antiperoxidativa frente al modelo micelar metil linoleato/ β -caroteno. *N*-metil laurotetanina también presentó moderada capacidad de atrapar radicales libres frente al modelo DPPH. La habilidad de estos compuestos para inhibir la peroxidación lipídica se presume principalmente por la capacidad que tienen los alcaloides de extinguir el oxígeno singlete para así retardar la etapa de iniciación de la oxidación del metil linoleato. Además, de acuerdo con los valores obtenidos en la peroxidación lipídica para los diferentes compuestos, no hay grandes diferencias en los resultados; de tal manera que no parece determinante la presencia de los hidrógenos reactivos en las moléculas para atrapar los radicales peroxilos ROO• y se remarcan más los otros dos mecanismos de la peroxidación lipídica.

La actividad antiperoxidativa de alcaloides oxoaporfínicos nunca ha sido reportada previamente; este trabajo reporta una buena actividad antiperoxidativa de la oxoaporfina dicentrinona.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la Universidad de Antioquia a través del proyecto de Sostenibilidad 2001-2004.

REFERENCIAS

- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K.** 2002. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst* 127:183-198.
- Basu TK, Temple NJ, Garg ML.** 1999. *Antioxidant in Human Health and Disease*, CAB International, New York.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C.** 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol* 28:25-30.
- Cassels BK, Asencio M, Conget P, Speisky H, Videla L, Lissi E.** 1995. Structure-antioxidative activity relationships in benzyloquinoline Alkaloids. *Pharmacological Res* 31(2):103-107.
- Guinaudeau H, Leboeuf M, Cavé A.** 1975. Aporphinoid alkaloids I. *Lloydia* 38(4):275-338.
- Guinaudeau H, Leboeuf M, Cave A.** 1979. Aporphinoid alkaloids II. *J Nat Prod* 42(4):325-360.
- Kerem Z, Regev-Shoshani G, Flaishman MA, Sivan L.** 2003. Resveratrol and two monomethylated stilbenes from israeli *rumex bucephalophorus* and their antioxidant potential. *J Nat Prod* 66:1270-1272.
- Kwiek JJ, Haystead TAJ, Johannes R.** 2004. Kinetic mechanism of quinone oxidoreductase 2 and its inhibition by the antimalarial quinolines. *Biochemistry* 43:4538-4547.
- Kim JP, Jung MY, Kim J, Kim SY.** 2000. Antiphotooxidative activity of protoberberines derived from *Coptis japonica* Makino in the chlorophyll-sensitized photooxidation of oil. *J Agric Food Chem* 48:1058-1063.
- Kougure K, Goto S, Abe K, Ohiwa CH, Akasu M, Terada H.** 1999. Potent antiperoxidation activity of the bisbenzyloquinoline alkaloid cepharanthine: the amine moiety is responsible for its pH-dependent radical scavenge activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426:133-142.
- Larson R.** 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27:969-978.
- Marco GJ.** 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 45:594-598.
- Martínez L, Ríos J, Payá M, Alcaraz MJ.** 1992. Inhibition of nonenzymic lipid peroxidation by benzyloquinoline alkaloids. *Free Radical Biol Medic* 12:287-292.
- Misik B, Bezakova L, Malekova L, Kostalova D.** 1995. Lipoygenase inhibition and antioxidant properties of protoberberine and aporphine alkaloids isolated from Mahonia aquifolium. *Planta Medica* 61:372-373.
- Pérez E.** 2003. Química, actividad antiplasmódica y antioxidante de los alcaloides de *Duguetia vallicola* (Annonaceae). Tesis de Maestría. Instituto de Química, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Valentao P, Fernandes E, Carbalho F, Branquinho Andrade P, Seabra RM, Bastos ML.** 2002. Studies on antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biol Pharm Bull* 25(10):1324-1327.
- Yamaguchi F, Ariga T, Yoshimura Y, Nakazawa H.** 2000. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* Fruit Rind. *J Agric Food Chem* 48:180-185.
- Zhou B, Jia ZS, Chen ZH, Yang L, Wu LM, Liu ZL.** 2000. Synergistic antioxidant effect of green tea polyphenols with α -tocopherol on free radical initiated peroxidation of linoleic acid micelles. *J Chem Soc Perkin Trans 2*:785-791.