

**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**

**Facultad de Medicina**



**Nitrocatecoles derivados de hidroxitirosol.  
Síntesis, biodisponibilidad y evaluación de  
su capacidad antioxidante y neuroprotectora**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Elena Gallardo Morillo**

Bajo la dirección de los doctores

José Antonio González Correa

M<sup>a</sup> Raquel Mateos Briz

José Luis Espartero Sánchez

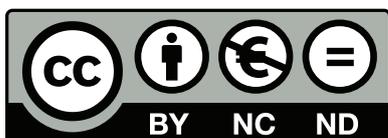
Málaga, Noviembre de 2014



**Publicaciones y  
Divulgación Científica**

AUTOR: Elena Gallardo Morillo

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Farmacología y Pediatría**

**D. JOSE ANTONIO GONZALEZ CORREA**, Doctor en Medicina y Cirugía adscrito al Área de Farmacología del Departamento de Farmacología y Pediatría de la Universidad de Málaga, **D<sup>a</sup>. RAQUEL MATEOS BRIZ**, Doctora en Ciencias Químicas adscrita al Departamento de Metabolismo y Nutrición del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (CSIC) de Madrid y **D. JOSÉ LUIS ESPARTERO SANCHEZ**, Doctor en Farmacia, adscrito al Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que D<sup>a</sup>. ELENA GALLARDO MORILLO ha obtenido y estudiado personalmente bajo nuestra dirección el material necesario para la realización de su Tesis Doctoral titulada **Nitrocatecoles derivados de hidroxitirosol. Síntesis, biodisponibilidad y evaluación de su capacidad antioxidante y neuroprotectora**, la cual ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo los que la suscriben revisado su Tesis y estando conformes para ser juzgada.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedimos el presente certificado en Málaga a treinta de septiembre de dos mil catorce.



## Agradecimientos

Siempre he pensado que la verdadera fortuna consiste en saber aprovechar las oportunidades que la vida te brinda. Y es que no podía imaginar todo cuanto iba a sobrevenirme cuando me embarqué en la experiencia del Doctorado. Han sido largos cuatro años de intensas idas y venidas donde, además de ser bien conocida en las estaciones de Renfe, el esfuerzo y sacrificio han conducido a un claro enriquecimiento profesional y personal. El bagaje recorrido se ha ido cimentando gracias al apoyo de muchas de las personas a las cuales va dirigido este apartado. No han sido necesarios grandes gestos, también los pequeños, incluso de aquellas personas que pudieron pasar de puntillas, me han ayudado a empujar este proyecto. Y sólo por eso, merecen mi más sincera gratitud.

Lo primero es hacer mención a la Universidad de Málaga, en particular al Departamento de Farmacología el cual me ha acogido siempre tan amablemente de la mano de algunos de sus profesores como Encarni, Eli e Inma.

Con una mención especial, a José Antonio González Correa, uno de mis directores de tesis y persona influyente en mi proceso de madurez científica. No puedo olvidar la confianza siempre depositada en mí, sus ganas de seguir investigando y sus señas de identidad, cohesión en el equipo y perseverancia en el trabajo. Gracias.

A José Pedro de la Cruz, por brindarme esa oportunidad a la cual inicialmente me refería y por trasladarme a la visión aplicada de la investigación cuando apenas entendía de la práctica básica de laboratorio.

A todo el equipo de trabajo, Maribel, Bea, Miriam, María, M<sup>a</sup> Dolores, José Julio, Antonio y también, Antonio Pino. Pero en especial a las dos constantes vitales del grupo, Juan y Ana, por vuestro apoyo y en especial a ti, Ana, por tu paciente escucha.

Y casi sin preverlo me colé en un nuevo Departamento, el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, al que tanto le debo. En una ciudad y Facultad diferentes, las personas de este Departamento me ayudaron a salvar distancias. Más allá de la adscripción de mi beca-contrato, mi experiencia allí habla de lo personal. Felipe, Pepe, Fernando, M<sup>a</sup> De Gracia, Inmaculada Fernández, gracias por la consideración siempre conmigo y por hacerme sentir como en casa.

A José Luis, mi segundo director de tesis, porque cualquier persona que tenga oportunidad de conocerte no podría obviar tu calidad humana. Me has sabido trasladar sabios consejos y valores que no han pasado inadvertidos a lo largo de estos años y hoy ocupan un sólido lugar en mi vida. Has sido guía y apoyo. Has sido dentro y fuera del trabajo. Nunca olvidaré las largas horas de dedicación para ayudarme a entender de química y también, el esfuerzo por hacerme un hueco en la docencia. Has sabido contagiarme de tu pasión por ella y gracias a ti, me llevo el mejor recuerdo posible. Gracias por estar siempre ahí.

A Mariana. Te considero maestra, mentora y refugio a la vez. Lograste enseñarme también el lenguaje y la pasión hacia la química entre "productitos", matraces y rotavapores. Me enseñaste a adquirir confianza y seguridad haciendo de mí una persona con coraje, luchadora. Gracias, bonita Mariana.

A Andrés, las palabras que te definen son las de compañero y amigo. Tu hospitalidad y cálido trato, junto a tu mujer Rocío, me facilitaron una adaptación a mi nuevo lugar de trabajo y también, a Sevilla. Siempre os estaré agradecida por hacer dulce esa etapa.

A mis otros compañeros, Belén, Cristina, Rocío, Marta y Lucía. Y en especial a Ahmed e Irene, por mirarme siempre con transparencia.

A Sole, por tu trato amable y dulce. No se te puede no querer. A Vicky, Margarita y Elena Benito, porque me habéis demostrado que, a pesar de la sobrecarga de trabajo, siempre hay tiempo para ser compañeros y atender a las personas que lo merecen. Sois un bien preciado. Gracias por estar ahí.

A mis alumnos, porque de no haber sido por vosotros, mi experiencia académica-investigadora hubiera estado coja. Sois la razón por la que un profesor siempre está dispuesto a superarse cada día.

Y si pensaba que la experiencia había colmado expectativas, llegó Madrid. El ICTAN, dentro del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), se convirtió también en morada. Y aunque la vida en Madrid pueda parecer algo más hostil, las personas que conoces a su paso te convencen de lo contrario.

A ti Raquel, mi tercera directora, porque tu esfuerzo por conciliar tus obligaciones con mi tesis me ha ayudado a conocer la fortaleza que demuestras. Siempre te mostraste cálida y cercana. Pero sin lugar a dudas, siempre has mostrado confianza en mi persona lo cual ha sido esencial para seguir adelante. No me olvido de la última semana trepidante en Madrid. Fuiste soporte, cimiento y amiga en esta larga y última andadura, por eso sólo puedo darte las gracias.

A Laura, por tu calidez también conmigo. Por acogerme en tu equipo y hacer sentirme una más y comportarme de forma natural, algo que valoro muchísimo. Por volverme a ver pasado un tiempo y todo ser igual. Por trasladarme valores de esfuerzo y constancia para lograr los objetivos en el largo camino de la investigación. Por todo ello, gracias.

A Luis, Sonia, Nines y Bea. Cuando hablaba de Madrid y su gente, me podría referir perfectamente a vosotros. Hacéis fácil el paso de cualquier persona por allí. Sois estupendos.

A mis niños: Ilde, Javi, Ben, Isa, Rosana, Giselle y Miren. A Gema, porque sin tú saberlo me enseñaste. A Mirari, por derrochar empatía. A Rocío, porque haces mejor la vida de aquel que se cruza por tu camino. Y a mis dos pilares, Marta y Sara. Porque con vosotros tuve que redimensionar el concepto de amistad y aún ando buscando la palabra adecuada. Sois tremendas (¿Esa es la palabra?). Gracias por vuestras continuas muestras de apoyo. Os quiero.

Y en mi retorno a Andalucía, topé con otro Departamento, el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, también en la Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Fue una estancia más breve que las anteriores pero suficiente para detenerme en las personas que lo forman. José Luis Venero, Rocío, Ana, Antonio Ayala, Mario, Alejandro, M<sup>a</sup> José y Rianne. Os menciono con cariño porque todos habéis contribuido a mi bagaje por insignificante que penséis que pueda ser vuestra aportación. Pero sobre todo, porque siempre me habéis dirigido una amable sonrisa. Gracias.

A Antonio J., por tu generosidad e incondicional ayuda cuando la he necesitado.

Y a ti, Marti, no pudiéndome dirigir como director de tesis, me dirijo como persona también clave en mi enriquecimiento personal y profesional. Me has sabido enseñar prudencia en esta carrera y me has orientado siempre desde la humildad. Tu confianza en mí, así como en el trabajo desarrollado, me ha permitido avanzar en esta empinada recta final del Doctorado. Gracias por tu apoyo y por hacerme sentir, también, como en casa.

No puedo olvidar expresar mi gratitud a mis profesores de Biología que también me han acompañado en este camino. M<sup>a</sup> Dolores, Enrique, Pepe, gracias por creer en mí.

A la Junta de Andalucía, como organismo que ha permitido la financiación del Proyecto de Excelencia, a través del cual he disfrutado de mi beca-contrato durante estos cuatro años.

Al Dr. D. Juan Fernández-Bolaños, por facilitarme la materia prima, el hidroxitirosol, para el desarrollo de mi Tesis.

Finalmente, y dejando de lado el ámbito académico-científico, hago una parada en los agradecimientos de aquellas personas que enriquecen o han enriquecido sustancialmente mi vida.

A mi familia, a mi hermana y en especial, a mis padres. Porque no me cansaré de repetir que lo que hoy soy es gracias a vosotros. Porque vuestros valores y principios ayudan a caminar en suelo firme y porque si se abre brecha en el camino, vosotros estáis ahí para levantarme. Miguel de Cervantes decía que había que confiar en el tiempo, que suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades. La vida no es un camino de rosas pero vosotros me habéis dado las herramientas necesarias para quitar una tras otra sus espinas. Gracias por estar siempre ahí y contagiarme de amor. Os quiero.

Y a mi niño, Fernando. Bonito por dentro y bonito por fuera. Porque tu bondad no conoce límites y tu inteligencia tampoco. Eres compañero insustituible, arrojas luz en un marco de ilusión y perspectivas. Gracias por tu comprensión y tu apoyo. Siempre estaré en deuda contigo. Gracias por robarme cada día la mejor de mis sonrisas y en definitiva, por hacerme feliz. Te quiero, futuro marido.

A mis ángeles, mis abuelos, porque os llevo en el recuerdo y sé que veláis por mí.



Cada nuevo día ha de ser motivo para sonreír



**A mis ángeles**

**A mis padres**

**A Fernando**



## Lista de abreviaturas

### A

**AAD:** L-Aminoácido aromático descarboxilasa

**AAO:** Forma aldehídica del aglucón de la oleuropeína

**AAPH:** 2,2'-Azobis(2-amidino propano) diclorhidrato

**ABC:** Área bajo la curva

**ABTS:** Ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico)

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AGMI:** Ácidos grasos monoinsaturados

**AGS:** Ácidos grasos saturados

**ALDH:** Aldehído deshidrogenasa

**ANOVA:** Análisis de la varianza

**AOV:** Aceite de oliva virgen

**AOVE:** Aceite de oliva virgen extra

**AP:** Compartimento apical

**ARN:** Ácido ribonucleico

### B

**BHA:** Butilhidroxianisol

**BHE:** Barrera hematoencefálica

**BHT:** Butilhidroxitolueno

**BL:** Compartimento basolateral

### C

**Caco-2:** Línea de células epiteliales intestinales humanas

**Ccf:** Cromatografía en capa fina

**CI:** Ionización química

**COMT:** Catecol-O-metiltransferasa

**COSY:** Correlation Spectroscopy

**C-Pd:** Carbón paladio

### D

**DA:** Dopamina

**DAD:** Detector de diodo array

**DAOD:** Forma dialdehídica del aglucón de la oleuropeína descarboximetilada

**DCF:** Diclorofluoresceína oxidada

**DCFH:** Diclorofluoresceína

**DCFH-DA:** 2',7'-Diacetato de diclorofluoresceína

**DEM:** Maleato de dietilo  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**DMSO-d<sub>6</sub>:** Dimetilsulfóxido hexadeuterado  
**DOPAC:** Ácido 3,4-dihidroxifenilacético  
**DPPH:** 2,2-Difenil-1-picrilhidrazina  
**DTT:** Ditioneitol  
**DMEM:** Dulbecco Modified Eagle's Medium

## E

**ECACC:** Colección Europea de Cultivos Celulares  
**EFSA:** European Food Safety Authority  
**EM:** Espectrometría de masas  
**EP:** Enfermedad de Parkinson  
**EROs:** Especies reactivas de oxígeno

## F

**FAB:** Bombardeo con átomos acelerados  
**FBS:** Suero fetal bovino  
**FDA:** Food and Drug Administration  
**FeAs:** Sulfato ferroso y ácido ascórbico  
**FRAP:** Ferric reducing antioxidant power

## G

**GSH:** Glutathion reducido  
**GSSG:** Glutathión oxidado

## H

**5-HIAA:** Ácido 5-hidroxiindolacético  
**HepG2:** Línea de células de hepatoma humano  
**HMBC:** Hetero Multiple Bond Correlation spectroscopy  
**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución  
**HPLC-DAD:** Cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodo array  
**HPLC-ED:** Cromatografía líquida de alta resolución y detección electroquímica  
**HR:** Hipoxia-reoxigenación  
**HSQC:** Hetero Single Quanta Correlation spectroscopy  
**HTy:** Hidroxitirosol  
**HTy-A:** Acetato de hidroxitirosilo  
**HTy-E:** Éter etílico de hidroxitirosilo  
**HVA:** Ácido homovanílico  
**HVAL:** Alcohol homovanílico

## I-J

**IA:** Índice de absorción

**IC<sub>50</sub>:** Concentración inhibitoria 50

**J:** Constante de acoplamiento

## L

**LC-ESI-TOF-MS:** Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida con interfase electrospray y analizador de tiempo de vuelo

**LC-MS:** Cromatografía líquida acoplada a detector de espectrometría de masas

**LDH:** Lactato deshidrogenasa

**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad

**LDLox:** Lipoproteínas de baja densidad en su forma oxidada

**L-DOPA:** 3,4-Dihidroxifenil-L-alanina (levodopa)

**LPS:** Lipopolisacáridos

**LPO:** Productos de peroxidación lipídica o lipoperóxidos

## M

**[M]<sup>+</sup>:** Ion molecular

**[M-H]<sup>+</sup>:** Ion cuasimolecular

**[M+H]<sup>+</sup>:** Ion cuasimolecular

**MAO:** Monoamino oxidasa

**MDA:** Malondialdehído

**MS:** Espectrometría de masas

**MS-HR:** Espectrometría de masas de alta resolución

**MS-ESI:** Espectrometría de masas con fuente de ionización electrospray

**3-MT:** 3-Metoxitiramina

## N

**NEAA:** Aminoácidos no esenciales

**NO:** Óxido nítrico

**NO<sub>2</sub>HTy:** Nitrohidroxitirosol

**NO<sub>2</sub>HTy-A:** Acetato de nitrohidroxitirosilo

**NO<sub>2</sub>HTy-E:** Éter etílico de nitrohidroxitirosilo

**NOAEL:** No Observed Adverse Effects Level

**NOESY:** Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

**NOS:** Óxido nítrico sintasa

## O-P

**ORAC:** Oxygen Radical Scavenging Capacity

**8-oxo-dG:** 8-oxo-deoxiguanosina

**P.f.:** Punto de fusión

**Papp:** Coeficiente de permeabilidad aparente

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PSP:** fenolsulfonftaleína (colorante rojo fenol)

**pTsOH:** Ácido *p*-toluenosulfónico

## **R**

**REA:** Estudios de la relación estructura-actividad

**RLs:** Radicales libres

**RMCD:**  $\beta$ -Ciclodextrina metilada

**RMN:** Resonancia magnética nuclear

**<sup>13</sup>C-RMN:** Resonancia magnética nuclear de carbono-13

**<sup>1</sup>H-RMN:** Resonancia magnética nuclear de protón

## **S-T-U**

**SAM:** S-Adenosil-L-metionina

**TBARS:** Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

***t*-BOOH:** *tert*-Butilhidroperóxido

**TEAC:** Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox

**TEER:** Resistencia eléctrica transepitelial

**THF:** Tetrahidrofurano

**TPTZ:** Tripiridiltriazina

**TR:** Tiempo de retención

**Trolox:** ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

**TxB<sub>2</sub>:** Tromboxano B<sub>2</sub>

**Ty:** Tirosol

**UGT:** UDP-Glucuronosiltransferasa

<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>9</b>
2.1. Dieta mediterránea	9
2.1.1. Papel de los polifenoles. Evidencias científicas sobre sus beneficios	10
2.2. Los compuestos fenólicos del olivo y sus productos	12
2.3. Absorción, biodisponibilidad y metabolismo de la fracción fenólica del AOV	16
2.4. Obtención del hidroxitirosol	20
2.4.1. Aislamiento a partir de residuos del olivar	20
2.4.2. Síntesis del hidroxitirosol	21
2.5. Derivados sintéticos del hidroxitirosol	23
2.6. Actividad biológica del hidroxitirosol. Implicación en salud	24
2.6.1. Actividad antioxidante	26
2.6.1.1. Importancia de la estructura catecólica	26
2.6.1.2. Evaluación de la capacidad antioxidante de hidroxitirosol <i>in vitro</i>	27
2.6.1.3. Evaluación de la capacidad antioxidante en cultivos celulares	28
2.6.1.4. Efecto sobre la oxidación lipídica	28
2.6.1.5. Efecto sobre el daño oxidativo al ADN	29
2.6.1.6. Efecto sobre otros biomarcadores de oxidación	29
2.6.2. Actividad neuroprotectora	31
2.6.3. Actividad antiinflamatoria	32
2.6.4. Capacidad cardioprotectora	32
2.6.5. Prevención de la osteoporosis	33
2.6.6. Actividad antimicrobiana	33
2.6.7. Actividad anticancerosa	34
2.6.8. Actividad antidiabética	35
2.7. Estrés oxidativo e ictus isquémico	36
2.8. Estrés oxidativo y enfermedad de Parkinson	38
2.8.1. Estrés oxidativo mediado por hierro en la sustancia negra	40
2.9 Nitrocatecoles y tratamiento de la enfermedad de Parkinson	41
2.9.1. Nitrocatecoles como inhibidores de la COMT	42
<b>3. Objetivos</b>	<b>47</b>
<b>4. Materiales y Métodos</b>	<b>51</b>
4.1. Síntesis y determinación estructural de las nuevas sustancias	51
4.1.1. Aparatos y procedimientos analíticos generales utilizados	51
4.1.2. Sustancias comerciales empleadas	52
4.1.3. Aislamiento y purificación de hidroxitirosol a partir de alperujo	53
4.1.4. Reacción de nitración. Procedimiento general	54
4.1.5. Síntesis de nuevas sustancias	54
4.1.5.1. Obtención de ésteres de nitrohidroxitirosilo. Procedimiento general	54
4.1.5.2. Síntesis de los éteres alquílicos de nitrohidroxitirosilo	55
4.2. Estimación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	56
4.2.1. Capacidad reductora (Método FRAP)	56
4.2.2. Capacidad de secuestro de radicales libres	57
4.2.2.1. Método ABTS	57

4.2.2.2. Método ORAC (adaptación para compuestos lipofílicos)	58
4.2.3. Análisis estadístico de los resultados	60
4.2.3.1. Características muestrales	60
4.2.3.2. Análisis estadístico	60
4.3. Evaluación de la biodisponibilidad a nivel intestinal y hepático	60
4.3.1. Transporte y metabolismo a nivel intestinal	60
4.3.1.1. Establecimiento del cultivo celular	61
4.3.1.2. Evaluación del metabolismo en células Caco-2	63
4.3.1.3. Evaluación del transporte en células Caco-2	64
4.3.2. Biodisponibilidad y metabolismo a nivel hepático	65
4.3.2.1. Establecimiento del cultivo celular	65
4.3.2.2. Evaluación del metabolismo en células HepG2	65
4.3.3. Identificación de metabolitos	66
4.3.3.1. Reacción de hidrólisis enzimática	66
4.3.3.2. Reacción de conjugación <i>in vitro</i>	67
4.3.3.3. Análisis por HPLC	69
4.3.3.4. Análisis por LC-MS	70
4.4. Evaluación de la capacidad antioxidante y neuroprotectora de los nitroderivados de HTy en modelos experimentales de daño cerebral	70
4.4.1. Animal de experimentación	70
4.4.2. Tejido de estudio	71
4.4.3. Compuestos de análisis	72
4.4.4. Diseño experimental	72
4.4.4.1. Experimentos <i>in vitro</i>	72
4.4.4.3. Experimentos <i>ex vivo</i>	76
4.4.5. Variables analíticas	76
4.4.5.1. Variable principal: muerte celular cerebral	76
4.4.5.2. Variables predictoras: estrés oxidativo	76
4.4.6. Descripción de las técnicas analíticas	77
4.4.6.1. Determinación de muerte celular: Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)	77
4.4.6.2. Determinación del estatus oxidativo	78
4.4.7. Análisis estadístico de los resultados	83
4.5. Estudio del efecto de los nitroderivados del HTy sobre la actividad COMT	84
4.5.1. Animal de experimentación	84
4.5.2. Compuestos de análisis	84
4.5.3. Tipos de estudio	84
4.5.3.1. Estudio en tejido	85
4.5.3.2. Estudio en dializado: microdialísis	86
4.5.4. Análisis estadístico de los resultados	89

## **5. Resultados 93**

5.1. Síntesis y determinación estructural de las nuevas sustancias	93
5.1.1. Preparación y caracterización de ésteres de nitrohidroxitirosilo	93
5.1.1.1. Acetato de nitrohidroxitirosilo	93
5.1.1.2. Butirato de nitrohidroxitirosilo	93
5.1.1.3. Hexanoato de nitrohidroxitirosilo	94
5.1.1.4. Octanoato de nitrohidroxitirosilo	94
5.1.1.5. Decanoato de nitrohidroxitirosilo	94
5.1.1.6. Laurato de nitrohidroxitirosilo	95
5.1.1.7. Miristato de nitrohidroxitirosilo	95
5.1.1.8. Palmitato de nitrohidroxitirosilo	96
5.1.2. Preparación y caracterización de éteres de nitrohidroxitirosilo	96
5.1.2.1. 4-(2-Metoxietil)-5-nitrobenceno-1,2-diol	96

5.1.2.2. 4-(2-Etoxietil)-5-nitrobenzeno-1,2-diol	97
5.1.2.3. 4-(2-Butoxietil)-5-nitrobenzeno-1,2-diol	97
5.1.2.4. 4-(2-Hexiloxietil)-5-nitrobenzeno-1,2-diol	97
5.1.2.5. 4-Nitro-5-(2-octiloxietil)benzeno-1,2-diol	97
5.2. Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los nitroderivados lipofílicos de HTy	99
5.2.1. Caracterización antioxidante de los derivados acíclicos de nitrohidroxitirosilo	99
5.2.1.1. Ensayo FRAP	99
5.2.1.2. Ensayo ABTS	99
5.2.1.3. Ensayo ORAC	100
5.2.2. Caracterización antioxidante de los derivados alquílicos de nitrohidroxitirosilo	101
5.2.2.1. Ensayo FRAP	101
5.2.2.2. Ensayo ABTS	101
5.2.2.3. Ensayo ORAC	101
5.2.3. Comparación de la actividad antioxidante de las dos series de compuestos derivados del nitrohidroxitirosilo	102
5.3. Estudio de la biodisponibilidad y metabolismo de los nitroderivados de HTy <i>in vitro</i>	104
5.3.1. Transporte y metabolismo de los compuestos fenólicos <i>in vitro</i> en células Caco-2	104
5.3.1.1. Optimización del modelo celular de epitelio intestinal humano con células Caco-2	104
5.3.1.2. Identificación y caracterización del metabolismo de los nitroderivados de HTy por células Caco-2	106
5.3.1.3. Transporte transepitelial de los nitrocatecoles	114
5.3.1.4. Cuantificación de los metabolitos derivados de NO <sub>2</sub> HTy, NO <sub>2</sub> HTy-A y NO <sub>2</sub> HTy-E	115
5.3.2. Biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos <i>in vitro</i> en células HepG2	119
5.3.2.1. Metabolismo hepático de los nitrocatecoles	119
5.3.2.2. Identificación y caracterización del metabolismo de los nitrocatecoles	120
5.3.2.3. Cuantificación del metabolismo de los nitrocatecoles tras 2 y 18 h de incubación con células HepG2. Análisis comparativo	124
5.4. Evaluación de la capacidad antioxidante y neuroprotectora de los nitroderivados de HTy en modelos experimentales de daño cerebral	126
5.4.1. Resultados correspondientes a los experimentos <i>in vitro</i>	126
5.4.1.1. Resultados de las variables del tejido cerebral sometido a inducción química	126
5.4.1.2. Resultados de las variables del tejido cerebral sometido a hipoxia-reoxigenación	136
5.4.2. Resultados correspondientes a los experimentos <i>ex vivo</i>	144
5.5. Estudio del efecto de los nitroderivados de HTy sobre la actividad COMT	145
5.5.1. Estudio en tejido	145
5.5.1.1. Efecto sobre la DA y sus metabolitos	145
5.5.2. Estudio en dializado: microdialisis	148
5.5.2.1. Estudio de la perfusión intracerebral de los compuestos	148
5.5.2.2. Efecto sobre la DA y sus metabolitos	151
<b>6. Discusión</b>	<b>157</b>
6.1. Síntesis y determinación estructural de las nuevas sustancias	157
6.1.1. Preparación de ésteres de nitrohidroxitirosilo	157
6.1.2. Determinación estructural de los ésteres derivados de nitrohidroxitirosilo	158

6.1.2.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	158
6.1.2.2. Espectrometría de masas (EM)	162
6.1.3. Preparación de éteres alquílicos de nitrohidroxitirosilo	164
6.1.4. Determinación estructural de los éteres derivados de nitrohidroxitirosilo	165
6.1.4.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	154
6.1.4.2. Espectrometría de masas (EM)	168
6.2. Determinación de la actividad antioxidante in vitro de los nitroderivados lipofílicos de HTy	169
6.3. Determinación de la biodisponibilidad y metabolismo de los nitroderivados de HTy	172
6.3.1. Transporte y metabolismo a nivel intestinal	173
6.3.2. Biodisponibilidad y metabolismo a nivel hepático	177
6.4. Evaluación de la capacidad antioxidante y neuroprotectora de los nitroderivados de HTy en modelos experimentales de daño cerebral	179
6.4.1. Valoración del efecto antioxidante en tejido cerebral	180
6.4.2. Estudio del efecto neuroprotector	185
6.5. Estudio del efecto de los nitroderivados del HTy sobre la actividad COMT	188
6.5.1. Estudios en tejido	189
6.5.1.1. Efecto sobre la DA y sus metabolitos	189
6.5.1.2. Comparación de los tratamientos agudo y crónico	192
6.5.2. Estudios en dializado: microdiálisis	193
6.5.2.1. Efecto sobre la DA y sus metabolitos	194
<b>7. Conclusiones</b>	<b>201</b>
<b>8. Referencias</b>	<b>207</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>231</b>
9.1. Entidades que participan en la Tesis Doctoral	231
9.2. Financiación Proyecto P09-AGR-5098	234
9.3. Producción científica relacionada con la Tesis Doctoral	235
9.3.1. Publicaciones a revistas científicas	235
9.3.2. Comunicaciones a congresos	238
9.4. Espectros de masas	249
9.5. Espectros UV-visible	255

# 1. INTRODUCCIÓN



La dieta mediterránea (DM) es objeto de numerosos estudios en cuanto a los efectos beneficiosos que produce en el organismo, principalmente, por su incidencia positiva en la prevención de los accidentes cardiovasculares. De hecho, recientemente, ha sido recomendada por la UNESCO como una dieta prototipo de valor mundial (Bach-Faig y cols., 2011).

El éxito de esta dieta es atribuido, fundamentalmente, a su componente graso mayoritario, el aceite de oliva virgen (AOV). Su importancia radica en su alto contenido en ácido oleico y en compuestos fenólicos. Estos últimos destacan por su elevada actividad antioxidante, sobre todo, los *orto*-catecoles. El hidroxitirosol (HTy) es uno de estos biofenoles y se encuentra en diversas fuentes naturales, siendo especialmente importante su presencia en el olivo, ya sea libre o en forma de un glucósido derivado, denominado oleuropeína, principal compuesto fenólico presente en la aceituna (Vázquez, 1978).

Durante el proceso de extracción del AOV, la mayor parte de los biofenoles indicados se quedan en la fase acuosa semisólida, denominada alperujo, debido a su carácter hidrosoluble (Mateos y cols., 2001).<sup>\*</sup> No obstante, una pequeña fracción de derivados liposolubles de HTy pasa al aceite, junto a otros biofenoles, lo cual, es suficiente para proteger al AOV de la oxidación y el enranciamiento que sufre durante el tiempo de su vida útil (Mateos y cols., 2003).

En los últimos años, el HTy se ha convertido en objeto de numerosos estudios por parte de diferentes grupos de investigación de todo el mundo. Presenta una capacidad protectora frente a la oxidación mucho mayor que los aditivos antioxidantes habitualmente utilizados por la industria alimentaria, fundamentalmente, tocoferoles y BHT (Servili y cols., 1996). Sin embargo, su

---

<sup>\*</sup> De hecho, en la producción del AOV, el 80% del total de la aceituna que se moltura es desechado en forma de residuo. En este sentido, se producen unos 10 millones de toneladas al año de desechos sólidos o semisólidos, a nivel mundial, derivados de la industria olivarera. El almacenamiento o reciclaje de estos desechos supone un grave problema medio ambiental debido a su alto contenido en materia orgánica (Arvanitoyannis y cols., 2007).

## 1. Introducción

carácter prácticamente insoluble en medio lipofílico hace que no pueda ser utilizado en este tipo de alimentos.

Además de poseer propiedades antioxidantes, se ha demostrado que el HTy presenta una variada gama de actividades biológicas como son: actividad antimicrobiana, antihipertensiva, hipoglucémica, antiagregante plaquetaria, cardioprotectora y antiinflamatoria (Visioli y cols., 2002a; Tuck y Hayball, 2002a; Bianco y Ramunno, 2006; Covas y cols., 2006a y b; Bendini y cols., 2007), aparte de inhibir la proliferación y promover la apoptosis en numerosas líneas celulares tumorales humanas (Fabiani y cols., 2009). Por último, pero no menos importante, en la última década se ha puesto de manifiesto mediante técnicas de acoplamiento (docking) que la presencia de un resto lipofílico es necesaria para una buena actividad anticancerosa en diversos *orto*-catecoles estudiados (Hrenn y cols., 2006).

De hecho, y teniendo en cuenta el elevado interés en el uso de fitoquímicos como ingredientes para alimentos funcionales con valor nutricional añadido, el HTy ya ha sido utilizado, con buenos resultados, como ingrediente bioactivo en alimentos como zumo de tomate (Larrosa y cols., 2003), pan (Siebrecht, 2008) o salchichas (Cofrades y cols., 2011).

Por otra parte, en los últimos años, se han preparado varios tipos de derivados de HTy con el fin de modular su balance hidrófilo/lipófilo para su posible uso en la protección de los alimentos grasos frente a la oxidación, o para aumentar su biodisponibilidad en el organismo. Entre estos derivados cabe destacar los ésteres (Alcudia y cols., 2004; Torres y cols., 2005; Trujillo y cols., 2006; Grasso y cols., 2007), isocromanos (Guiso y cols., 2001; Lorenz, 2006) o éteres (Madrona y cols., 2009). Estos derivados han mostrado actividades similares o incluso mejoradas (Trujillo y cols., 2006; Lorenz, 2006; Pereira-Caro y cols., 2009) respecto al propio HTy libre, siendo, en la mayoría de los casos, más liposolubles.

En este contexto, hace algunos años se inició una serie de colaboraciones, que se mantienen en la actualidad, entre el Departamento de Farmacología y Pediatría (Facultad de Medicina, Universidad de Málaga), el Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla), el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

(Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla) y el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC, Madrid), para el estudio y aprovechamiento de la fracción fenólica de la aceituna. Estas colaboraciones se han enmarcado en tres proyectos de investigación (Cert y cols., 2004; Cert y cols., 2007; Espartero y cols., 2009) y han dado lugar a la publicación de numerosos artículos (Mateos y cols., 2001, 2003, 2005, 2008; Alcudia y cols., 2004; Trujillo y cols., 2006; González-Correa y cols., 2008a, 2008b, 2009; Madrona y cols., 2009; Rodríguez y cols., 2009; Pereira-Caro y cols., 2009, 2010a, 2010b, 2012; Piersanti y cols., 2011; Muñoz-Marín y cols., 2012, 2013; Guerrero y cols., 2012; Burattini y cols., 2013; Calderon-Montaña y cols., 2013; Reyes y cols., 2013) y comunicaciones a congresos, así como a la presentación de dos patentes internacionales (Alcudia y cols., 2004; Cert y cols., 2012).

Dentro de este marco de colaboración, nos hemos propuesto el estudio de nuevos antioxidantes derivados de HTy, en los que se introduce una modificación fundamental en el anillo fenólico como es la incorporación de un grupo nitró ( $\text{NO}_2$ ). La combinación de la presencia de este grupo electroatrayente con la longitud y naturaleza de la cadena lateral podría permitir la modulación de la actividad antioxidante de los nuevos compuestos sintetizados.

Además, la introducción del grupo nitró en este tipo de compuestos les podría conferir la capacidad de inhibir la catecol *orto*-metiltransferasa (COMT), enzima implicada en la degradación de la dopamina, neurotransmisor cuyo déficit produce la enfermedad de Parkinson (EP).

Por todo ello, en la presente Memoria se describe la síntesis y determinación estructural de dos series de nitrocatecoles derivados de HTy. Seguidamente, se presenta la evaluación de su metabolismo y biodisponibilidad a nivel intestinal y hepático. Finalmente, se exponen los estudios preclínicos de los nuevos compuestos, desde el punto de vista de su potencial antioxidante y neuroprotector para la prevención del ictus isquémico, así como su capacidad potencial de inhibición de la COMT.

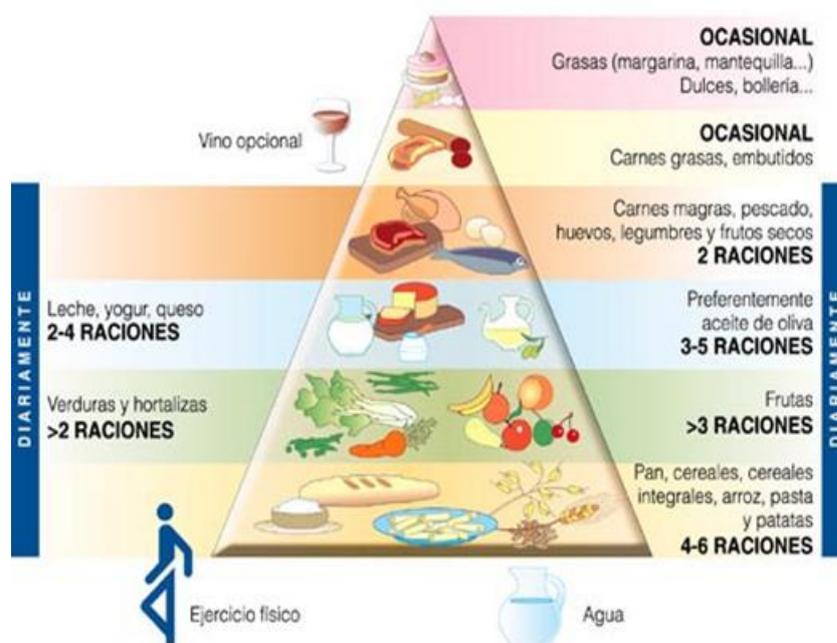


## 2. ANTECEDENTES



## 2.1. Dieta mediterránea

Los hábitos alimentarios desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la salud, tanto a nivel individual como poblacional. Actualmente, la dieta mediterránea se considera el modelo de alimentación más saludable y que, desde sus orígenes, ha respondido al patrón alimentario caracterizado por un consumo elevado de verduras, hortalizas, frutas, pasta, arroz, frutos secos, leguminosas y una rica variedad de pescados, además de aceite de oliva virgen (AOV) y vino tinto. En este sentido, la dieta mediterránea se ajusta adecuadamente a las recomendaciones de la conocida “pirámide nutricional” (Figura 2.1), a pesar de ser un modelo de alimentación con un elevado contenido graso, en contraste con las dietas recomendadas durante décadas por los nutricionistas anglosajones (Pérez-Jiménez y cols., 2005).



**Figura 2.1**

Raciones recomendadas para los principales grupos de alimentos. Pirámide nutricional adaptada a la dieta mediterránea. (Fuente: Sociedad Canaria de Endocrinología y Nutrición, SOCAEN).

En los últimos años, numerosas investigaciones han avalado la adherencia a este paradigma de la alimentación asociándolo a una menor mortalidad global y una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares (Toledo y

cols., 2013; Rees y cols., 2013; Guasch-Ferré y cols., 2014; López-García y cols., 2014; Chiva-Blanch y cols., 2014; Casas y cols., 2014), cáncer (Pelucchi y cols., 2009; Giacosa y cols., 2013; Grosso y cols., 2013) y enfermedades inflamatorias (Lucas y cols., 2011; Parkinson y Keast, 2014).

El hecho de responder a un patrón de alimentación basado en una tradición antigua y sin efectos perjudiciales evidentes, ha despertado en las últimas décadas el interés por parte de la comunidad científica para ser considerada una herramienta prometedora desde el punto de vista de la salud pública. En ese sentido, el Comité Intergubernamental de la UNESCO ha acordado inscribir la Dieta Mediterránea en la lista representativa del Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad. Los efectos beneficiosos de la dieta mediterránea en la salud se deben a la variedad, dosis y equilibrio de los macronutrientes que se aportan encaminados a construir un patrón dietético en el que los diferentes nutrientes puedan tener efectos sinérgicos cuando se consumen de forma combinada (Hu, 2002). Ese paradigma, basado en el consumo combinado de alimentos concretos, viene caracterizado por un bajo contenido en ácidos grasos saturados (AGS) y alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), carbohidratos complejos y fibra, junto con un aporte importante de compuestos bioactivos de origen vegetal. Entre ellos, cabe destacar las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, los carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos, cuya actividad antioxidante y efectos beneficiosos potenciales han sido y están siendo ampliamente investigados.

### **2.1.1. Papel de los polifenoles. Evidencias científicas sobre sus beneficios**

“*Compuestos fenólicos*”, “*polifenoles*” o “*biofenoles*” son términos que se utilizan en la bibliografía para designar aquellas sustancias que poseen un anillo de benceno con uno o más grupos hidroxilo y que pueden presentar otros grupos funcionales (Harborne y cols., 1989). Están universalmente presentes en los sistemas biológicos y, en especial, en el reino vegetal, principalmente, en los frutos, aunque también en hojas, flores y otros órganos vegetales.

Los efectos saludables de los polifenoles presentes en los alimentos han sido repetidamente asociados a procesos de captación de radicales libres (RLs) y actividad antioxidante, íntimamente ligados a enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y cáncer, entre otros, como procesos subyacentes. Por esta razón, numerosos estudios en los últimos años han ido encaminados a la evaluación de la capacidad antioxidante de determinados alimentos (Huang y cols., 2005; Wolfe y cols., 2008; Finley y cols., 2011) y su correlación con el contenido en polifenoles.

Hoy se sabe que los compuestos fenólicos son más que simples antioxidantes, estando implicados en numerosos mecanismos y rutas moleculares que justifican los beneficios que se les atribuyen. Entre los efectos saludables derivados de los mismos, Valls-Pedretet y cols (2012) demostraron que el mayor consumo de alimentos ricos en antioxidantes y, particularmente, ricos en polifenoles, se asocia con un mejor estado cognitivo en una población anciana con alto riesgo cardiovascular. Otros estudios asocian el consumo de una dieta rica en compuestos polifenólicos con una menor incidencia de cáncer de pecho (Couto y cols., 2013), próstata (Ferrís-Tortajada y cols., 2012) y colon-rectal (Djuric, 2011). También se ha comprobado que el consumo de una dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra o nueces reduce el riesgo de eventos cardiovasculares en sujetos con elevado riesgo cardiovascular (Estruch y cols., 2013).

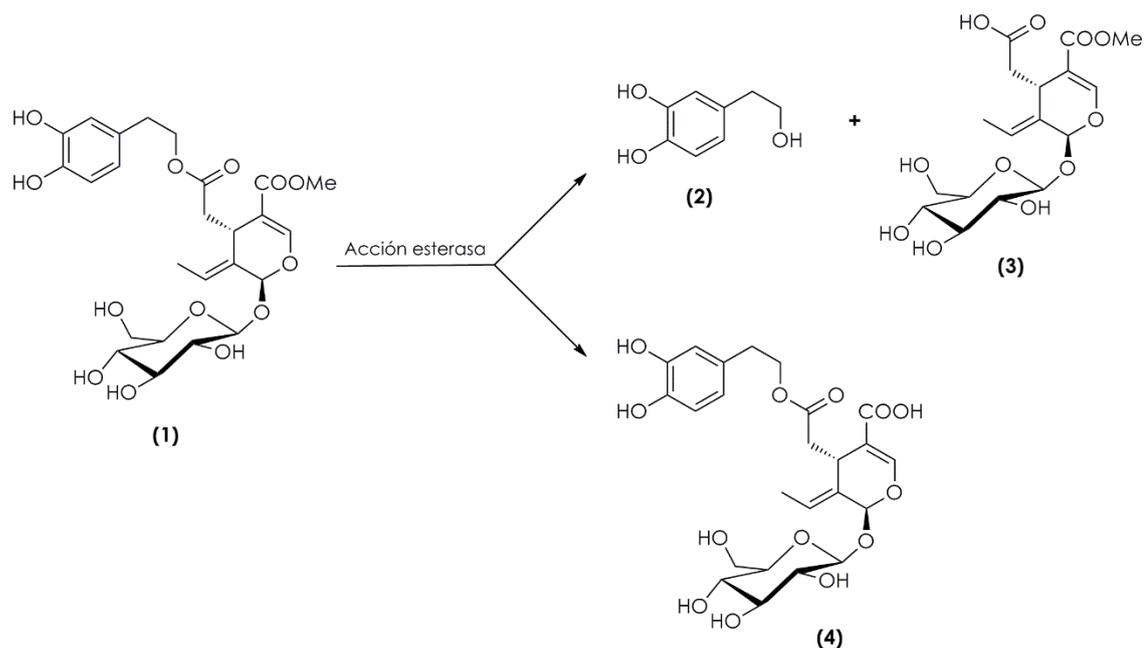
Asimismo, otros estudios describen efectos saludables de los polifenoles en la mejora de procesos inflamatorios digestivos, obesidad, diabetes, hipertensión y síndrome metabólico (Curtis y cols., 2012; Hooper y cols., 2012; Farràs y cols., 2013).

Aunque son numerosas las fuentes dietéticas ricas en compuestos fenólicos como por ejemplo el té, el café, el cacao, el vino además de las frutas y verduras, el presente trabajo se centra en derivados de los compuestos fenólicos presentes en el olivo.

## 2.2. Los compuestos fenólicos del olivo y sus productos

El AOV es un alimento tradicional que está constituido, principalmente, por triglicéridos ( $\geq 98\%$ ) y mezclas complejas de componentes menores ( $\sim 2\%$ ) de naturaleza química muy diversa. Históricamente, la calidad nutricional otorgada al AOV se atribuía a su alto contenido en ácido oleico. Sin embargo, actualmente la presencia de ácido oleico en elevada concentración no es exclusiva del AOV, ya que nuevas variedades de aceite de girasol y de colza presentan una composición en ácidos grasos similar a la del aceite de oliva. No obstante, el AOV debe ser considerado un producto exclusivo gracias a sus componentes minoritarios, entre los cuales se encuentran **los compuestos fenólicos**. Tanto los componentes mayores como menores muestran una composición cualitativa y cuantitativa muy variable, dependiendo de la variedad de aceituna, condiciones climáticas y agronómicas, calidad y estado de madurez del fruto o el sistema de extracción del aceite (Cantarelli, 1961; Montedoro y Cantarelli, 1969; Solinas y cols., 1978; Montedoro y Garofolo, 1984; Amiot y cols., 1986; Solinas, 1987; Di Giovacchino y cols., 1994).

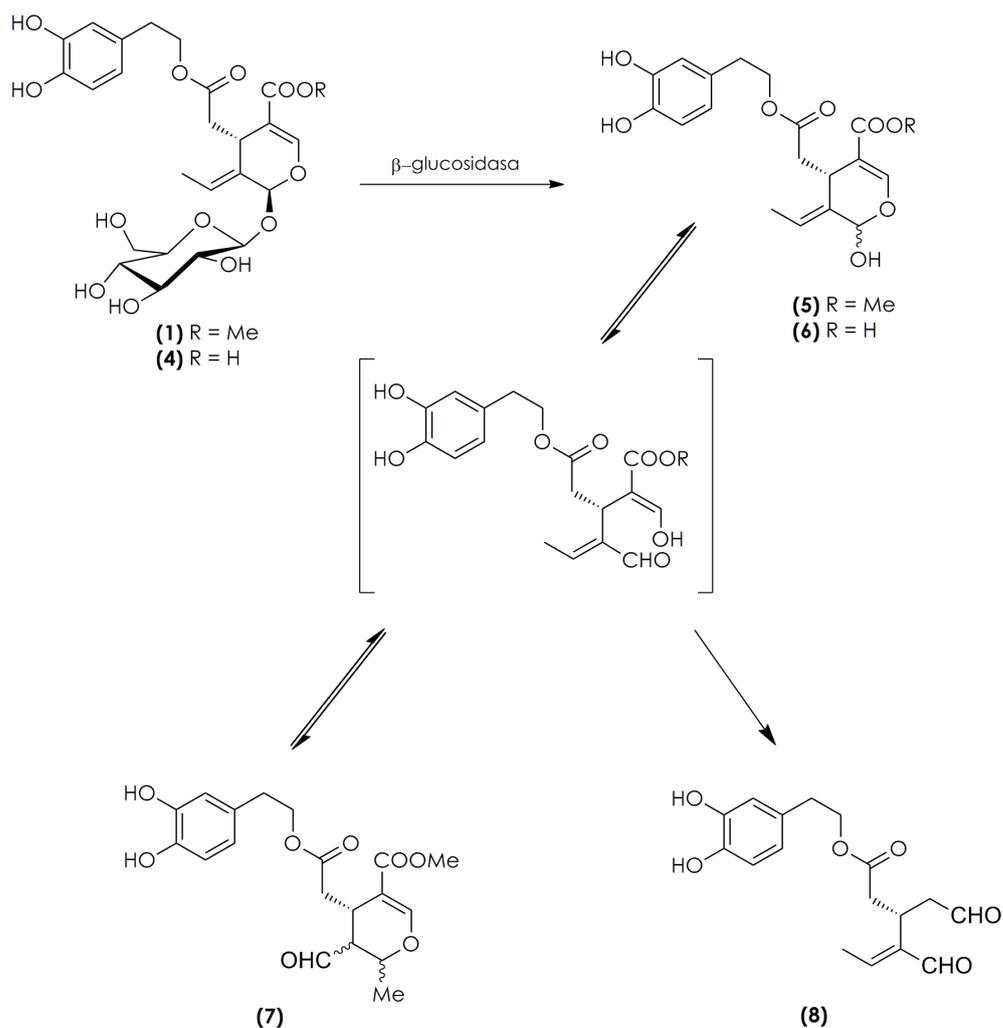
El principal compuesto fenólico presente en la **aceituna** es la oleuropeína **(1)** que se forma por la esterificación de hidroxitirosol (2-(3',4'-dihidroxifenil) etanol), HTy **(2)**, con el glucósido del ácido elenólico **(3)** (Panizzi y cols., 1960). Las aceitunas verdes contienen una gran proporción de compuestos fenólicos y, para el caso particular de la oleuropeína, su contenido puede alcanzar hasta el 14% de la materia seca. Por otra parte, el glucósido del ácido elenólico **(3)** y la desmetiloleuropeína **(4)** se forman por degradación de la oleuropeína y van aumentando a lo largo de la maduración, en la medida que aumenta la actividad esterasa, atribuyéndose a esta enzima la formación de estos dos compuestos (Amiot y cols., 1986) (Esquema 2.1).

**Esquema 2.1**

Formación del hidroxitirosol (2), glucósido del ácido elenólico (3), y la desmetiloleuropeína (4) por degradación de la oleuropeína (1)

Otro proceso enzimático importante que se produce durante la maduración de la aceituna es la hidrólisis del enlace glucosídico presente en la oleuropeína, por acción de  $\beta$ -glucosidasas presentes en el fruto. El aglucón resultante (5) sufre transformaciones posteriores y, mediante equilibrios tautoméricos ceto-enólicos que implican la apertura del anillo heterocíclico (Angerosa y cols., 1996) origina diversos estereoisómeros que se denominan en conjunto forma aldehídica del aglucón de la oleuropeína (AAO, 7) (Esquema 2.2).

## 2. Antecedentes



**Esquema 2.2**

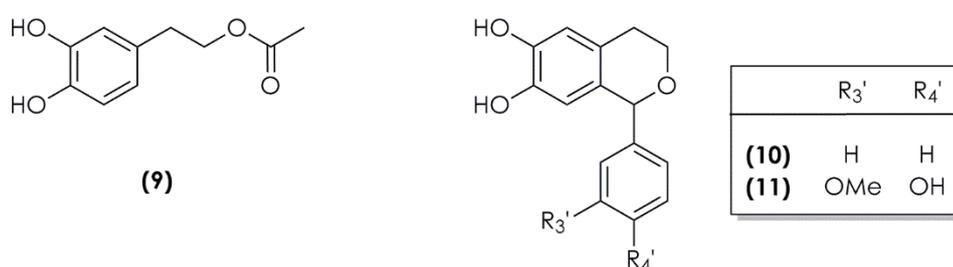
Formación de los derivados secoiridoideos del hidroxitirosol

En un proceso similar, a partir de la desmetiloleuropeína (4) se obtiene el aglucón (6) que se descarboxila e isomeriza a la estructura dialdehídica (8), que se denomina forma dialdehídica del aglucón de la oleuropeína descarboximetilada (DAOD) (Esquema 2.2). Al conjunto de estas sustancias producidas durante la maduración del fruto se las denomina derivados secoiridoideos.

Durante el proceso de extracción del **aceite**, la oleuropeína, por su carácter hidrosoluble, no se incorpora al mismo, permaneciendo en el alperujo. El propio HTy, que se produce por la hidrólisis del enlace éster en la oleuropeína o en sus productos de degradación, sólo se encuentra en cantidades mínimas en aceites recién obtenidos debido a su escasa solubilidad en el aceite (Mateos y cols., 2001). Sin embargo, la concentración

de HTy libre suele aumentar con el envejecimiento del aceite, como consecuencia de la hidrólisis de los derivados secoiridoideos. Así pues, entre los componentes mayoritarios de la fracción fenólica del AOV se encuentran los derivados secoiridoideos antes mencionados, alcanzando concentraciones entre 50 a 800 mg/Kg, lo que da idea de su mayor lipofilia.

En los últimos años se han identificado otros derivados de HTy en el AOV: el acetato de hidroxitirosilo (HTy-A) **(9)** (Brenes y cols., 1999; Espartero y cols., 1999) y los 1-aryl-6,7-dihidroxi-isocromanos (Bianco y cols., 2001) **(10, 11)** (Esquema 2.3).



**Esquema 2.3**

Acetato de hidroxitirosilo **(9)** y 1-aryl-6,7-dihidroxi-isocromanos **(10 y 11)**

Cabe destacar que, además de todos estos derivados del hidroxitirosol, se encuentran en el AOV otros compuestos fenólicos tales como el tirosol (Ty) y sus derivados y, en menor proporción, otros como los ácidos cinámico y sus derivados: ácidos ferúlico, *p*-cumárico, *o*-cumárico, cafeico y sinapínico; derivados del ácido benzoico: ácidos gálico, protocatéquico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico, 3,4,5-trimetoxibenzoico y gentísico; así como derivados del ácido fenilacético: ácidos *p*-hidroxifenilacético y homovanílico. También se han detectado flavonoides, fundamentalmente la apigenina y luteolina y, en menor proporción, la apigenina-7-glucósido y luteolina-7-glucósido, vanillina y otros componentes polares de carácter no fenólico, como los ácidos quínico y shiquímico (Montedoro y cols., 1992; Hrenn y cols., 2006).

Al **alperujo** pasan la mayor parte de los compuestos fenólicos presentes en la aceituna, bien como glucósidos inalterados o bien como los productos de las hidrólisis enzimática y química que tienen lugar durante la maduración del fruto. La concentración de compuestos fenólicos en el alperujo varía entre 1,3

y 4,0% sobre residuo seco (Paredes y cols., 1999), siendo los otros componentes sustancias minerales, azúcares, ácidos orgánicos no fenólicos, proteínas, lípidos, taninos y residuos sólidos en suspensión.

### 2.3. Absorción, biodisponibilidad y metabolismo de la fracción fenólica del AOV

La actividad biológica *in vivo* de cualquier compuesto fitoquímico, incluidos los compuestos fenólicos, siempre vendrá condicionada, inequívocamente, por su estabilidad digestiva, la extensión de su absorción y el metabolismo sufrido. El conocimiento de dicha biodisponibilidad y metabolismo es fundamental a fin de demostrar en estudios futuros que los metabolitos, a las concentraciones biodisponibles, resultan también beneficiosos (Tomás-Barberán y Andrés-Lacueva, 2012), pues son las moléculas disponibles a nivel sistémico y, por tanto, las que mediarán la actividad biológica de dichos compuestos.

La estructura química de los polifenoles, más que su concentración, determina el rango de absorción y la naturaleza de los metabolitos circulantes en el plasma. Los polifenoles más comunes de nuestra dieta no son necesariamente los que producen una mayor concentración de metabolitos activos en los tejidos diana (D'Archivio y cols. 2010).

Aunque para la mayoría de los polifenoles presentes en el AOV existía información limitada sobre su biodisponibilidad, en los últimos años se ha realizado un considerable esfuerzo en la comprensión de la absorción y el metabolismo de estos compuestos. Así, se ha demostrado mediante diferentes estudios tanto en animales (D'Angelo y cols., 2001; Visioli y cols., 2001; Tuck y cols., 2001, 2002; Rodríguez-Gutiérrez y cols., 2012) como en humanos (Miró-Casas y cols., 2003; Visioli y cols., 2003; García-Villalba y cols., 2010; Suárez y cols., 2011; Rubió y cols., 2012; De Bock y cols., 2013; García-Villalba y cols., 2014) con dietas suplementadas en AOV de composición fenólica variable, que sus principales fenoles, concretamente el HTy, Ty y sus derivados, son biodisponibles de forma dosis-dependiente.

Cabe destacar el estudio llevado a cabo por Vissers y cols. (2002) con individuos ileostomizados, donde se confirmó la absorción de hasta un 66% de los fenoles ingeridos a través del AOV en el intestino delgado, siendo éste el principal órgano implicado en la absorción de estos compuestos. Para el caso del HTy, se ha descrito una absorción rápida, alcanzando la máxima concentración en plasma entre 1 y 2 horas de la ingesta, seguido de un rápido descenso (Rubio y cols., 2012).

Además, su absorción viene determinada por el vehículo de administración, como observaron Tuck y cols. (2001) en un estudio llevado a cabo con ratas. Estos autores evaluaron el HTy excretado en la orina, cuantificando una absorción del 75 y 99% tras su administración mediante una disolución acuosa y oleosa, respectivamente. En línea con estos resultados, Visioli y cols (2003), evaluaron comparativamente la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos entre humanos y ratas mediante diferentes vías de administración, y observaron una mayor excreción de HTy en la orina humana que en la de ratas y un porcentaje de recuperación dependiente del modo de administración, alcanzando un 44% cuando se ingería en forma de AOV, 23% adicionado al aceite de oliva refinado y 13% en forma de yogur.

Las modificaciones metabólicas que sufren los compuestos fenólicos del AOV, ocurren a través de una secuencia de reacciones comunes para todos ellos y similar a la detoxificación metabólica que sufren muchos xenobióticos para reducir su potencial efecto citotóxico, incrementar su hidrofiliidad y facilitar su eliminación urinaria o biliar (Manach y cols., 2004). Durante su absorción y/o distribución, los polifenoles están sometidos principalmente a la acción de las enzimas de fase II, dando lugar a derivados metilados, sulfatados y/o glucuronidados principalmente, por tanto las estructuras químicas que se identifican en el plasma y en los tejidos son muy distintas de las que están presentes en los alimentos.

En estudios con humanos, más del 90% de los fenoles identificados en plasma y orina aparecen conjugados (Tuck y cols., 2002b; Miró-Casas y cols., 2003; Visioli y cols., 2003, entre otros) principalmente derivados glucuronidados y, en menor proporción, fenoles libres y O-metil derivados, como el alcohol homovanílico (HVAL) con o sin glucuronidación adicional. Recientemente, se

## 2. Antecedentes

han analizado muestras de orina de voluntarios sanos tras la ingesta de 50 mL de AOVE rico en polifenoles, mediante una técnica analítica considerablemente más sensible que las utilizadas hasta la fecha, la espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida, con interfase electrospray y analizador de tiempo de vuelo (LC-ESI-TOF-MS) (García-Villalba y cols., 2010). Los resultados de dicho estudio han permitido avanzar considerablemente en el conocimiento de la biodisponibilidad de los fenoles del aceite al identificar más de 50 metabolitos procedentes de reacciones de las fases I y II de biotransformación, no sólo derivados del HTy y Ty, sino de otros componentes no identificados hasta la fecha en orina como derivados secoiridoideos, lignanos y flavonoides, y que alcanzaron su concentración máxima al cabo de las 2 h de administración. De esta manera, se confirma por primera vez la absorción efectiva, en mayor o menor medida, de todos los compuestos que componen la fracción fenólica del AOV, siendo los metabolitos procedentes del HTy y sus derivados secoiridoideos los más abundantes, fundamentalmente, en sus formas metiladas y glucuronidadas. Por último, cabe destacar que el equipo de Motilva y cols., (Suarez y cols., 2011) han descrito como metabolito mayoritario tras la ingesta de AOV rico en fenoles, el derivado sulfatado de HTy. Asimismo, han caracterizado la presencia del derivado sulfatado de HTy-A en plasma (Rubio y cols., 2012).

Para identificar asociaciones entre la ingesta de polifenoles y estado de salud en los estudios de cohorte, por ejemplo, es muy importante identificar biomarcadores de ingesta a partir de alimentos comúnmente consumidos en nuestra dieta, como el AOV. Considerando la recuperación tan alta descrita en orina para el HTy, de forma dosis dependiente, este compuesto, en forma de sus derivado sulfatados, podría constituir un potencial biomarcador según se ha sugerido recientemente (Pérez-Jiménez y cols., 2010).

Por otro lado, el conocimiento de las formas conjugadas de los polifenoles del AOV en la circulación periférica, así como en otros tejidos, es esencial para obtener información adicional acerca de su mecanismo de acción *in vivo* (Kroon y cols., 2004). En este sentido se ha demostrado en estudios *in vitro* cómo la conjugación puede afectar a la actividad del compuesto fenólico. Así, Tuck y cols. (2002b) encontraron mayor capacidad de captación de RLs

para los derivados monoglucuronidados de HTy que para su precursor mediante el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH), mientras que el derivado sulfatado no mostró ninguna actividad. En contraste con estos resultados, recientemente se ha evaluado la actividad antioxidante de concentraciones fisiológicas (0,01–10  $\mu$ M) de conjugados monoglucuronidados mediante los ensayos DPPH e inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por cobre, no observándose actividad antioxidante significativa de dichos metabolitos a las concentraciones ensayadas (Khymenets y cols., 2010). Se puede concluir que la conjugación de los compuestos fenólicos del aceite de oliva tras su absorción puede modificar la actividad antioxidante *in vitro*, aunque no es posible extrapolar estos resultados a una situación *in vivo*.

Finalmente, la identificación de los órganos diana de los metabolitos es importante para entender el mecanismo de acción de cualquier compuesto bioactivo. Existen pocos estudios a este respecto que aborden la distribución tisular de compuestos fenólicos, pero cabe destacar el llevado a cabo en animales de experimentación tras administración intravenosa de HTy radiactivo (D'Angelo y cols., 2001). Los resultados revelaron una absorción rápida y extensiva por parte de los órganos y tejidos investigados, tales como el músculo esquelético, el hígado, los pulmones o el corazón y, de manera preferencial, el riñón. Además, el 90% de la radiactividad administrada se detectó en la orina recogida hasta 5 h después de la administración, principalmente, en sus formas conjugadas, mientras que alrededor del 5% se encontró en las heces y el contenido gastrointestinal. En línea con estos resultados Serra y cols (2012) observaron que los fenoles de un AOV se absorbieron, metabolizaron y distribuyeron a través de la sangre a prácticamente todas las partes del cuerpo e, incluso, atravesaron la barrera hematoencefálica.

## 2.4. Obtención de hidroxitirosol

### 2.4.1. Aislamiento a partir de residuos del olivar

Los residuos generados por la industria olivarera son una excepcional fuente de HTy. Su aislamiento y posterior purificación a partir de estas fuentes han dado lugar a distintos estudios de bioactividad, biodisponibilidad, toxicología o de interacciones con ingredientes alimentarios.

Hasta la fecha se han descrito numerosos ensayos para la producción de HTy de alto grado de pureza a partir de distintas fuentes como las hojas del olivo, las aguas de lavado de las aceitunas o el alperujo. Así, Briante y cols. (2004) han sido capaces de producir grandes cantidades de HTy mediante la biotransformación de extractos de hojas de olivo por la acción de una enzima  $\beta$ -glucosidasa hipertermofílica inmovilizada en un soporte de quitosano, aprovechando la capacidad de la quitina y el quitosano de adsorber moléculas polares como el HTy. Otro procedimiento para la obtención de HTy a partir de las hojas de olivo emplea dióxido de carbono supercrítico sobre el extracto crudo obtenido de la hoja (Tabera y cols., 2004).

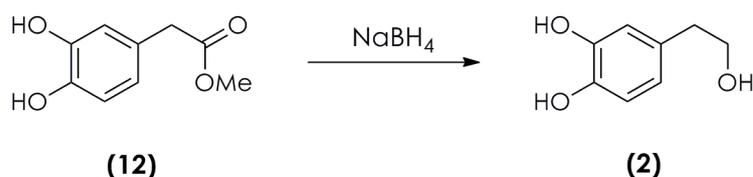
Por otro lado, también se ha estudiado el aislamiento y purificación de HTy a partir de las aguas de lavado de las aceitunas, así como de las aguas residuales que se generan durante el procesado de las mismas. En este sentido, Brenes-Balbuena y cols. (2003) pusieron a punto un procedimiento, protegido bajo patente, por el que, tras una etapa de almacenamiento y fermentación, se lleva a cabo un proceso de extracción con ultrafiltración y adsorción en resinas no iónicas que da lugar a un extracto cuya concentración en HTy está entre el 60 y 80%.

El grupo del Dr. Fernández-Bolaños (Fernández-Bolaños y cols., 2005), del Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla), ha desarrollado un sistema de aislamiento y purificación de HTy, a escala industrial, a partir del alperujo, igualmente protegido bajo patente y que permite su obtención a bajo coste. En este caso la etapa clave del proceso es el empleo de una resina de intercambio iónico que atrapa los antioxidantes de la fracción acuosa, seguido de una elución

con agua. El extracto que se obtiene rico en HTy se purifica tras su paso a través de otra resina, esta vez no iónica, y lavado con una mezcla de metanol/agua o etanol/agua. El residuo final libre de disolventes proporciona el HTy en un 95% de pureza.

### 2.4.2. Síntesis de hidroxitirosol

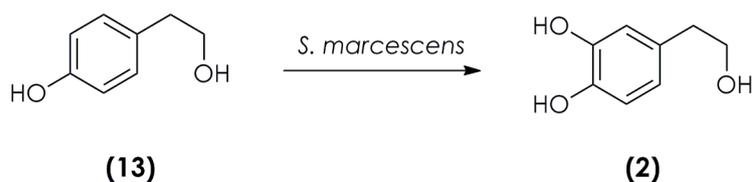
Los numerosos estudios (*in vitro* e *in vivo*) que evidencian los beneficios del HTy ha impulsado la búsqueda de nuevas vías que faciliten su obtención. Por ello, es cada vez más habitual encontrar en la literatura nuevos protocolos de síntesis de HTy, en la medida de lo posible sencillos, de altos rendimientos químicos y económicamente ventajosos. Así, Bianco y cols. (1988) llevaron a cabo la síntesis de HTy mediante la reducción con borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ) del 3,4-dihidroxifenilacetato de metilo (**12**) con un rendimiento del 80% (Esquema 2.4).



**Esquema 2.4**

Síntesis de hidroxitirosol por Bianco y cols.(1988)

Por otra parte, Espín y cols. (2001) llevaron a cabo la biotransformación del Ty (**13**) en HTy mediante una oxidación con una oxidasa que cataliza reacciones de hidroxilación de fenoles a *o*-difenoles y *o*-quinonas. De forma similar, Allouche y Sayadi (2005) prepararon HTy a partir de tirosol usando la especie bacteriana *Serratia marcescens*, con un rendimiento del 80% tras siete horas de incubación (Esquema 2.5).

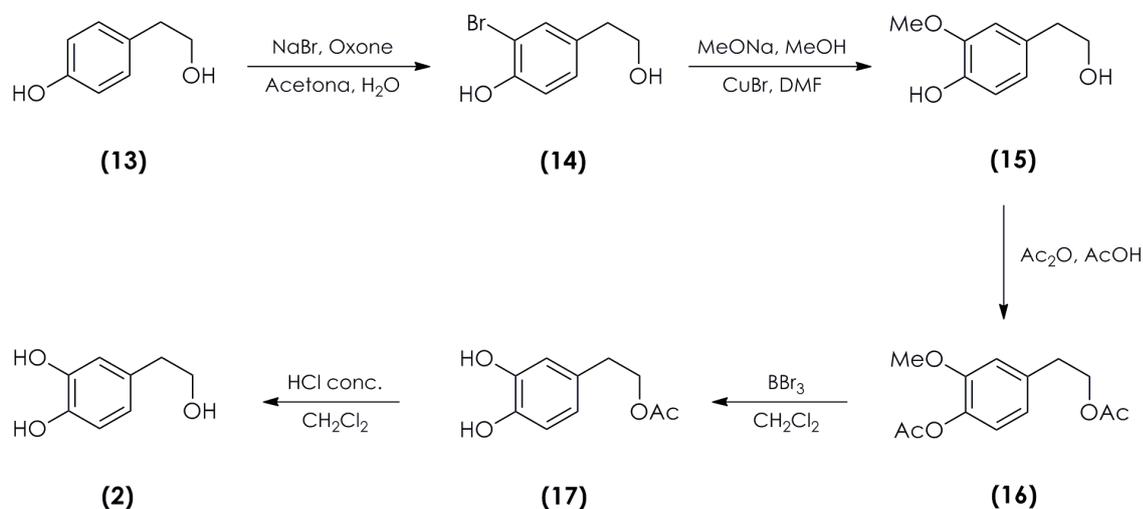


**Esquema 2.5**

Síntesis de hidroxitirosol por Allouche y Sayadi (2005)

## 2. Antecedentes

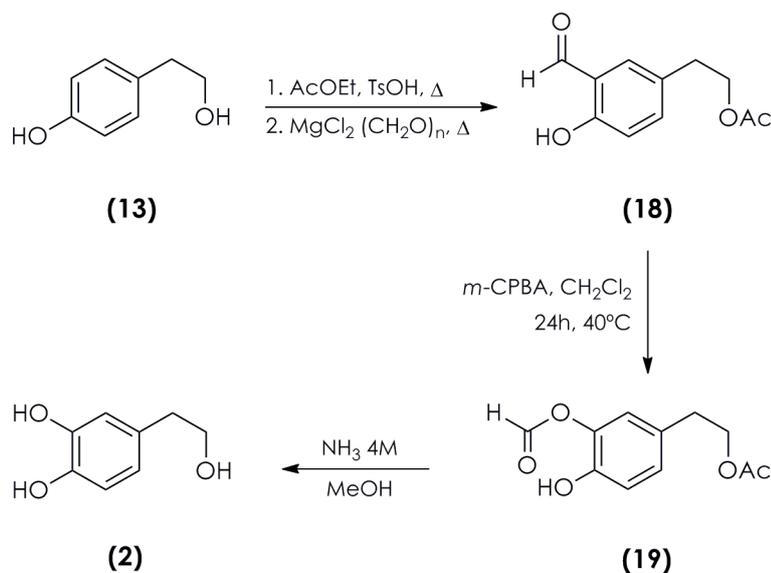
Más recientemente, Bovicelli y cols. (2007) han descrito la síntesis de HTy a partir de Ty siguiendo una ruta en varias etapas, todas ellas con excelentes rendimientos (Esquema 2.6).



**Esquema 2.6**

Síntesis de hidroxitirosol por Bovicelli y cols. (2007)

Finalmente, nuestro grupo de investigación, en colaboración con el grupo del Prof. Giovanni Zappia de la Universidad de Urbino (Italia), ha propuesto otra ruta alternativa de obtención de HTy a partir de Ty mediante un procedimiento sintético en tres etapas, en el que el paso clave es una oxidación de Baeyer-Villiger (Piersanti y cols., 2011), tal como se muestra en el Esquema 2.7.



**Esquema 2.7**

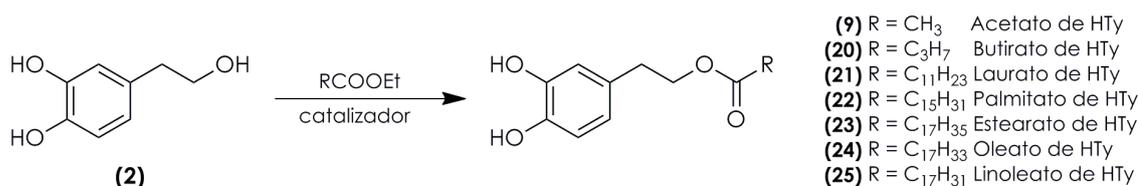
Síntesis de hidroxitirosol por Piersanti y cols. (2011)

Además, la síntesis de HTy ha sido objeto de varias patentes. Así, Barontini y cols. (2007) han sintetizado HTy a través de una desmetilación oxidativa del HVAL previa protección del alcohol primario presente en su estructura. Finalmente, Álvarez de Manzanaeda y cols. (2009) han descrito la síntesis de HTy empleando como productos de partida 3,4-metilendioxi-bencenos.

## 2.5. Derivados sintéticos del hidroxitirosol

La actividad biológica asociada al HTy y en particular su excelente capacidad antioxidante le convierte en un compuesto con un gran atractivo industrial para su uso como componente funcional de alimentos, nutracéuticos y/o cosméticos. Sin embargo, la solubilidad del HTy en productos grasos es limitada por su naturaleza polar. Por ello, no es de extrañar que en los últimos años haya aumentado el interés en la obtención de derivados sintéticos que, manteniendo la actividad antioxidante original, posean características funcionales mejoradas, fundamentalmente el aumento de la lipofilia.

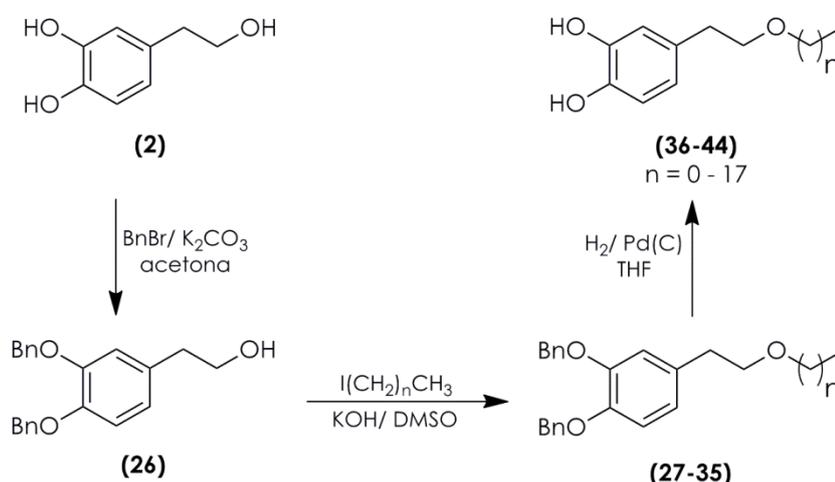
Por todo lo expuesto anteriormente, es razonable que los primeros derivados sintéticos preparados hayan resultado ser análogos a los encontrados de forma natural en el aceite de oliva (véase apartado 2.2). De esta forma, se describió inicialmente la obtención del derivado acílico de HTy (HTy-A) **(9)** mediante dos procedimientos bastante largos y tediosos (Baraldi y cols., 1983; Gordon y cols, 2001). Posteriormente, nuestro grupo patentó un procedimiento simple y eficaz de preparación para cualquier derivado acilado de HTy, incluido el acetato. Este procedimiento, que consta de una única etapa, permite obtener los ésteres grasos de HTy **(20–25)** con elevados rendimientos químicos (Alcudia y cols., 2004; Trujillo y cols., 2006) (Esquema 2.8).



**Esquema 2.8**

Síntesis de ésteres de hidroxitirosilo por Alcudia y cols. (2004)

Por otro lado, también se ha llevado a cabo la síntesis de éteres alquílicos de HTy (**36–44**), que presentan una unión éter que hace que sean más resistentes a la hidrólisis ácida que los ésteres anteriormente citados (Madrona y cols., 2009) (Esquema 2.9).



**Esquema 2.9**

Síntesis de éteres de hidroxitirosilo por Madrona y cols. (2009)

## 2.6. Actividad biológica del hidroxitirosol. Implicación en salud

Históricamente, las hojas del olivo se utilizaban en la terapia tradicional de antiguas civilizaciones. A mediados del siglo pasado, se descubrió que los extractos de las hojas del olivo tenían un efecto positivo sobre la hipertensión (Scheller, 1955; Perrinjaquet-Moccetti y cols., 2008; Susalit y cols., 2011) y, desde entonces, los beneficios de los componentes minoritarios de la aceituna se han investigado extensivamente (Trípoli y cols., 2005).

El verdadero interés del HTy se basa en su amplio espectro de actividades farmacológicas, además de aquella que inicialmente centró toda la atención, la capacidad antioxidante, siendo destacable el número de artículos y patentes relacionadas con esta molécula existente en la bibliografía (Visioli y Bernardini, 2011; Fernández-Bolaños y cols., 2012; Hu y cols., 2014). En la Figura 2.2 se representa la evolución de las más de 2.000 publicaciones relacionadas con el HTy a lo largo de los últimos 25 años.

Cabe decir que, a partir de un reciente estudio se ha concluido que esta sustancia no induce efectos que puedan ser considerados de relevancia

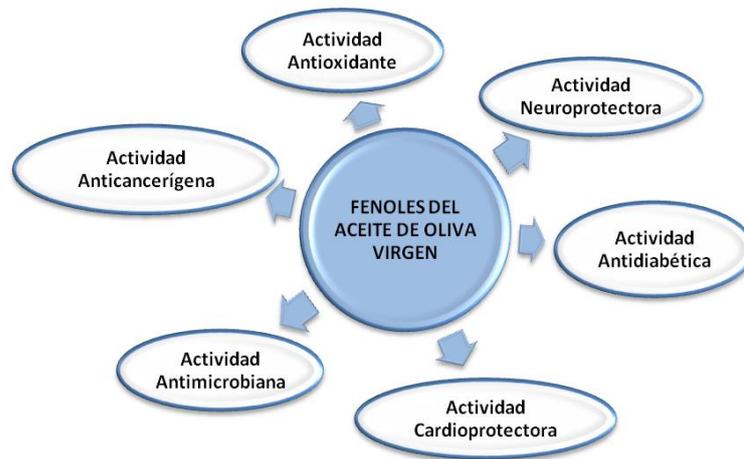
toxicológica, proponiendo así una dosis del HTy de 500 mg/Kg/día como umbral NOAEL (No Observed Adverse Effects Level) (Auñón-Calles y cols., 2013).



**Figura 2.2**

Evolución de los documentos relacionados con HTy publicados a lo largo de los últimos años (Fuente: Scifinder, fecha de acceso: 16/06/2014)

Todos estos estudios han puesto de manifiesto que el HTy está implicado en numerosos mecanismos y rutas moleculares que justifican los beneficios que se le asocian. En el Esquema 2.10 se indican algunas de las más representativas.



**Esquema 2.10**

Principales actividades biológicas asociadas al HTy

A continuación se exponen, de forma individualizada, cada una de ellas, haciendo especial hincapié en sus mecanismos de actuación antioxidante y

neuroprotector, propiedades que ocupan parte de los objetivos de esta tesis doctoral.

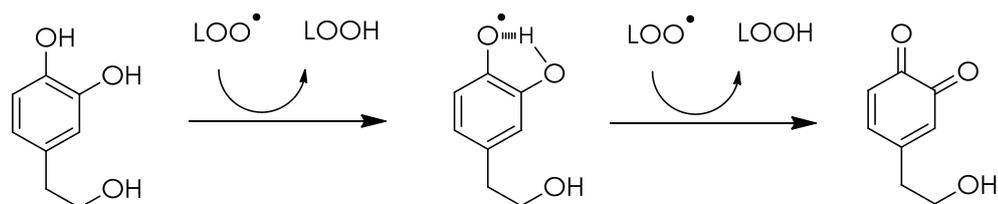
### 2.6.1. Actividad antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (EROs), que continuamente se están formando como resultado de procesos metabólicos en el organismo, pueden causar oxidación y daños en las macromoléculas celulares y, por lo tanto, pueden contribuir al desarrollo de enfermedades degenerativas, tales como la aterosclerosis, el cáncer, la diabetes, la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias (Balsano y Alisi, 2009).

#### 2.6.1.1. Importancia de la estructura catecólica

Los efectos beneficiosos atribuibles a los polifenoles presentes en la dieta se deben, entre otras cosas, a su efecto antioxidante, al neutralizar las especies reactivas de oxígeno protegiendo al organismo del daño oxidativo (Hollman y cols., 2011). La capacidad antioxidante es una de las propiedades más destacables del HTy y se relaciona directamente con la presencia de los grupos hidroxilos fenólicos (Rice-Evans y cols., 1996; Cao y cols., 1997, Bernini y cols., 2012). Así, la estructura ortodifenólica o catecólica del HTy caracteriza su potencial antioxidante.

En ese sentido, la unidad *orto*-catecólica (1,2-bencenodiol u *ortodihidroxifenol*) ha sido objeto de numerosas investigaciones que tratan de relacionar la actividad antioxidante y su estructura química, a fin de dilucidar el posible mecanismo de acción antioxidante (Povie y cols., 2010). En el esquema 2.11 se representa el mecanismo para el HTy, donde se produce la formación de un radical muy estable por la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el hidrógeno libre del grupo hidroxilo y el radical fenoxilo (Visioli y Galli, 1998). Así, se demuestra que la presencia del grupo catecol es crucial en la reactividad fenólica al actuar como donador de átomos de hidrógeno en los procesos de formación de radicales en cadena (Bernini y cols., 2012).

**Esquema 2.11**

Mecanismo antioxidante del HTy por donación de hidrógeno

Existen estudios basados en el cálculo de la energía de disociación del enlace O-H mediante descriptores termodinámicos, válidos para predecir la capacidad antioxidante de la estructura catecol *in vitro*; sin embargo, no son suficientes para predecir su efecto como secuestrador de RLs en medios fisiológicos. Para ello, en los últimos años ha sido de especial importancia desarrollar descriptores de la cinética de transferencia del átomo de hidrógeno entre el polifenol y los RLs en estudios de actividad antioxidante (Di Meo y cols., 2013).

#### 2.6.1.2. Evaluación de la capacidad antioxidante de HTy *in vitro*

Diversos estudios han puesto de manifiesto que los polifenoles totales presentes en el AOV están directamente relacionados con la estabilidad oxidativa del mismo, tanto en recipientes abiertos a baja temperatura (Gutfinger, 1981; Tsimidou y cols., 1992), como a altas temperaturas (100-120°C) por los métodos de oxígeno activo como el método Rancimat® (Vázquez y cols., 1975; Gutiérrez y cols., 1977), jugando un papel muy importante en la conservación de las características cualitativas del aceite. Posteriormente, este hecho ha sido corroborado al encontrarse una correlación aceptable con la estabilidad Rancimat a 100° C, corregida con un factor que tiene en cuenta la susceptibilidad oxidativa de la matriz según su composición en ácidos grasos (Cert y cols., 1996) y de triglicéridos (Mateos y cols., 2005a).

De entre todos los componentes de la fracción fenólica, el HTy ha mostrado una actividad antioxidante por encima del resto y su potencia en matrices lipídicas, es muy superior a la de otros antioxidantes comúnmente empleados como son  $\alpha$ -tocoferol (Baldioli y cols., 1996; Giovannini y cols., 1999; Gordon y cols., 2001), el ácido cafeico, el butilhidroxitolueno (BHT) y el butilhidroxianisol (BHA), aunque algo menor que la del galato de dodecilo (Papadopoulos y Boskou, 1991; Chimi y cols., 1998; Mateos, 2002).

### 2.6.1.3. Evaluación de la capacidad antioxidante en cultivos celulares

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado la capacidad del HTy para hacer frente al estrés oxidativo inducido por agentes oxidantes en diferentes líneas celulares. Así, se ha visto como el HTy y otros compuestos presentes en la fracción fenólica del AOV contrarrestan la citotoxicidad de las especies reactivas de oxígeno en células epiteliales de intestino humano Caco-2 (Deiana y cols., 2010), en células de melanoma (D'Angelo y cols., 2005), en células de hepatoma humano (Goya y cols., 2007) y en células epiteliales tubulares renales (Deiana y cols., 2008; Incani y cols., 2010). Esta capacidad protectora se fundamenta en la habilidad de los polifenoles para captar RLs (Tripoli y cols., 2005; Cornwell y Ma, 2008).

Por otra parte, se han encontrado evidencias que sugieren que los fenoles pueden ejercer una protección indirecta frente al estrés oxidativo mediante el mantenimiento equilibrado del sistema de defensa endógeno, inhibiendo el descenso de la concentración de glutatión intracelular reducido (GSH) y modulando la actividad y expresión de los enzimas antioxidantes (Masella y cols., 2004; Martin y cols., 2010), a través de un mecanismo que implica la activación de las rutas moleculares PI3K/AKT y ERKs y posterior translocación nuclear de Nrf2 en células HepG2, para el caso del HTy (Martin y cols., 2010).

### 2.6.1.4. Efecto sobre la oxidación lipídica

Conocida la relevancia de la oxidación de las LDL a su forma oxidada (LDL<sub>ox</sub>) en las lesiones tempranas en el proceso de la aterosclerosis, la inhibición de su oxidación por los polifenoles podría constituir una forma lógica de actuación de los mismos (Witztum, 1994).

Estudios de intervención han demostrado que los polifenoles del AOV aumentan la resistencia de las partículas LDL a la oxidación de manera dosis dependiente en voluntarios sanos (Nicolaiew y cols., 1998; Marrugat y cols., 2004; Weinbrenner y cols., 2004; Covas y cols., 2006a; Covas y cols., 2006b; Gimeno y cols., 2007; De la Torre-Carbot y cols., 2010) y en voluntarios con problemas cardiovasculares (Ramirez-Tortosa y cols., 1999; Fitó y cols., 2005).

Como resultado de estas investigaciones, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha establecido una nueva declaración nutricional para los polifenoles del AOV, que considera que el consumo diario de 5 mg de HTy y sus derivados en 20 g de AOV, tomado como parte de la dieta, puede proteger a las LDL del estrés oxidativo, manteniendo la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y del colesterol en sangre, la presión arterial y propiedades antiinflamatorias (EFSA, 2011, EC N° 1924/2006).

#### 2.6.1.5. Efecto sobre el daño oxidativo al ADN

Cualquier alteración oxidativa del ADN y ARN juega un papel esencial en la patogenia de las principales enfermedades degenerativas y, en particular, puede constituir el punto de partida para el desarrollo de cualquier tipo de cáncer (Cooke y cols., 2003).

La evaluación del efecto de los polifenoles sobre el daño oxidativo al ADN constituye otro mecanismo de actuación que pondría de manifiesto su actividad antioxidante. Sin embargo, los resultados derivados de los estudios de intervención para valorar la implicación de los polifenoles en la prevención de esta patología son poco concluyentes. Por ejemplo, a partir de un subgrupo de individuos participantes en el estudio EUROLIVE (Machowetz y cols., 2007) se observó una relación entre la ingesta de AOV durante 3 semanas por 182 voluntarios sanos y un descenso de los niveles urinarios del biomarcador 8-oxo-deoxiguanosina (8-oxo-dG), aunque fue independiente del contenido fenólico del aceite. Sin embargo, en un estudio previo realizado con 10 mujeres postmenopáusicas (Salvini y cols., 2006), se encontró una disminución de un 30% del daño oxidativo al ADN, medido en linfocitos de sangre periférica, tras el consumo durante 8 semanas de AOV rico en polifenoles (592 mg/Kg), en comparación con el grupo que consumió AOV con menor contenido fenólico (147 mg/Kg).

#### 2.6.1.6. Efecto sobre otros biomarcadores de oxidación

Los biomarcadores de daño oxidativo se basan en la medida de productos de oxidación relativamente estables, que derivan del daño a lípidos, proteínas y ADN. Asumiendo la relación entre el estrés oxidativo y la

## 2. Antecedentes

mayoría de los procesos degenerativos, la monitorización de estos biomarcadores permitirá evaluar el efecto de los compuestos fenólicos sobre una situación normal o de estrés inducido (Mateos y Bravo, 2007). Entre ellos, las niveles de LDLox, como biomarcador lipídico, y 8-oxo-dG, como biomarcador de ADN, ya se han comentado en un epígrafe aparte por la trascendencia que presentan en los procesos cardiovasculares y cancerígenos, respectivamente. Sin embargo, son numerosos los biomarcadores que, habitualmente, se vienen utilizando para el desarrollo de este tipo de estudios. F2-isoprostanos, lipoperóxidos (LPO) o malondialdehído (MDA) como indicadores de daño a lípidos, 8-hidroxi-deoxiguanosina como indicador de daño al ADN, o carbonilos como daño a proteínas, son los más utilizados. Otros relacionados con el sistema de defensa antioxidante no enzimático (GSH, glutatión oxidado (GSSG)) o enzimático (glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa y glutatión-S-transferasa) también permiten evaluar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Muchos de estos marcadores se han utilizado en un modelo de hipoxia-reoxigenación, que reproduce *in vitro* las condiciones fisiológicas que acontecen durante el desarrollo del ictus isquémico, para caracterizar comparativamente el carácter antioxidante del HTy y sus derivados lipofílicos (González-Correa y cols., 2007; González-Correa y cols., 2008b, Guerrero y cols., 2012; Muñoz-Marín y cols., 2012).

Igualmente, los biomarcadores de oxidación se toman como referencia para ahondar en la potencia antioxidante de cualquier fitoquímico en estudios de intervención con humanos. Por ejemplo, Visioli y cols. (2000), cuando administraron una única dosis de aceite rico en polifenoles a voluntarios sanos observaron un descenso significativo dosis-dependiente de la excreción de F2-isoprostanos en orina. Posteriormente, en línea con estos resultados, un estudio de intervención aleatorizado y cruzado llevado a cabo con 21 voluntarios hipercolesterolémicos que tomaron una única dosis de AOV rico en compuestos fenólicos, dio lugar a un descenso significativo de los niveles de F2-isoprostanos y LPO en comparación con el consumo de aceite bajo en compuestos fenólicos (Ruano y cols., 2005).

Covas y cols. (2006b) han mostrado que la ingesta de un aceite rico en compuestos fenólicos modula el balance entre el GSH y el GSSG de forma dosis dependiente. Por otro lado, Weinbrenner y cols. (2004) ofrecieron evidencias sobre la influencia de los compuestos fenólicos en el estado oxidativo/antioxidante en humanos al demostrar un incremento en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa después de la administración de aceite de oliva rico en compuestos fenólicos, junto con un descenso en los niveles de LPO, resultados totalmente coincidentes a aquellos publicados al año siguiente por Fitó y cols. (2005).

### **2.6.2. Actividad neuroprotectora**

El estrés oxidativo y nitrosativo elevado puede poner en peligro la integridad y la funcionalidad del tejido cerebral. Estudios epidemiológicos recientes indican que el consumo habitual del AOV está asociado a una reducción de los riesgos implicados en enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad, tales como el Alzheimer y el Parkinson (Scarmeas y cols., 2006; Berr y cols., 2009). Por un lado, los resultados del estudio de las “Tres Ciudades” (Berr y cols., 2009) reveló que los participantes con un consumo moderado o alto de aceite de oliva, en comparación con aquellos que no lo consumían, mostraron una menor probabilidad de déficit cognitivo para la fluidez verbal y memoria visual durante los 4 años de seguimiento de 6.947 sujetos. Por otro lado, los resultados publicados por Scarmeas y cols. (2006) en un estudio de seguimiento realizado con 2.258 sujetos, mostraron que una mayor adherencia a la dieta mediterránea se asocia con una reducción en el riesgo de padecer Alzheimer.

Recientemente, han proliferado hallazgos sobre los beneficios del HTy para prevenir las enfermedades neuronales. En particular, en un estudio realizado con ratas se ha demostrado que el HTy es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) (Wu y cols., 2009), evaluado en muestras de dializado mediante cromatografía líquida con detector de fluorescencia en ratas anestesiadas.

Otros estudios en animales han mostrado la eficacia de un extracto rico en HTy para reducir la citotoxicidad inducida por el óxido nítrico (NO) en las células de cerebro de ratón (Schaffer y cols., 2007). Resultados *in vitro* e *in vivo* han identificado que las mitocondrias se encuentran entre las dianas de prevención del HTy en el cerebro (Hu y cols., 2014). Finalmente, se ha mostrado el posible efecto neuroprotector del HTy, HTy-A y éteres de HTy en un modelo de hipoxia-reoxigenación en cortes de cerebro de rata, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los resultados indicaron la capacidad de estos compuestos para inhibir de manera dosis dependiente el flujo de lactato deshidrogenasa (LDH), proporcionando una base inicial para el estudio del HTy como un potencial compuesto neuroprotector (González-Correa y cols., 2008a, Guerrero y cols., 2012; Muñoz-Marín y cols., 2012).

### 2.6.3. Actividad antiinflamatoria

La inflamación y sus consecuencias tienen un papel crucial en el desarrollo de la aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares. Se ha demostrado que los polifenoles disminuyen la producción de marcadores inflamatorios, como el leucotrieno B<sub>4</sub>, en varios sistemas (Biesalski, 2007). En un estudio *in vitro* con macrófagos de ratón estimulados con lipopolisacáridos (LPS) se ha demostrado que el HTy inhibe la producción de factores mediadores de la inflamación, como son el óxido nítrico (NO) y las citoquinas (Richard y cols., 2011).

La administración oral de HTy a ratas con una inflamación en la pata, inducida experimentalmente, produjo una reducción significativa tanto del grado de hinchazón como del dolor (Gong y cols., 2009).

Asimismo, también se han confirmado los beneficios del HTy sobre la función plaquetaria, estrechamente relacionada con la inflamación, al demostrar que inhibe la inducción química de la agregación, la acumulación del pro-agregante tromboxano (TxB<sub>2</sub>) en suero humano, la producción de moléculas pro-inflamatorias de leucotrienos y la actividad de la lipoxigenasa araquidonato (Visioli y cols., 2002b, González-Correa y cols., 2008b, 2009).

#### 2.6.4. Capacidad cardioprotectora

También se ha vinculado el HTy con el aumento de la concentración de HDL (Covas y cols., 2006b). Aunque este efecto sobre HDL ha sido corroborado en otros estudios, EFSA concluyó que las evidencias existentes eran insuficientes para establecer una causa-efecto (EFSA, 2012).

El HTy ha demostrado ejercer un efecto beneficioso sobre la función plaquetaria, al reducir *in vitro* la expresión de moléculas de adhesión de células vasculares (Carluccio y cols., 2007) o inhibir *in vivo* la agregación plaquetaria en ratas (González-Correa y cols., 2008a). También en estudios de intervención con humanos, se ha relacionado el contenido fenólico del aceite de oliva rico en HTy y derivados con una disminución significativa del inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1) y el factor VII (FVIIa) asociados a cambios en el perfil hemostático postprandial, lo que lleva a un estado menos trombogénico (Ruano y cols., 2007).

Por último, el estudio clínico de intervención PREDIMED asoció una menor incidencia de eventos cardiovasculares en personas que habían consumido AOV rico en polifenoles en el marco de la dieta mediterránea, así como una mejora en la capacidad cognitiva de pacientes ancianos con factores de riesgo cardiovascular (Valls-Pedret y cols., 2012; Estruch y cols., 2013; Martínez-Lapiscina y cols., 2013).

#### 2.6.5. Prevención de la osteoporosis

El HTy puede tener un papel importante en la formación y mantenimiento de los huesos, y podría ser utilizado como un recurso efectivo en el tratamiento de los síntomas de la osteoporosis, ya que se ha descrito su capacidad para estimular la deposición de calcio e inhibir la formación de osteoclastos multinucleados de una manera dosis-dependiente. Además, el HTy también suprime la pérdida de masa ósea del hueso esponjoso en fémures de ratas ovariectomizadas (Hagiwara y cols., 2011).

### **2.6.6. Actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana del HTy y otros fenoles del olivo ha sido estudiada *in vitro* contra hongos, bacterias, virus y protozoos (Bisignano y cols., 1999; Zoric, 2013).

La investigación sobre la actividad *in vitro* antibacteriana del HTy concluye que este compuesto puede ser considerado como un agente antimicrobiano para el tratamiento de infecciones humanas causadas por cepas bacterianas o agentes casuales del tracto intestinal o respiratorio (Furneri y cols., 2004).

Otros estudios *in vitro* demuestran que los polifenoles del aceite de oliva son poderosos compuestos anti *Helicobacter pylori* (Romero y cols., 2007), una bacteria vinculada a la mayoría de úlceras pépticas y a algunos tipos de cáncer gástrico.

Por otra parte, tanto el HTy como la oleuropeína han sido identificados como una clase única de inhibidores que impiden la entrada del virus de la inmunodeficiencia humana en la célula huésped, inhibiendo la actividad de la integrasa VIH-1. Por lo tanto, estos agentes proporcionan una ventaja sobre otras terapias antivirales en el que, tanto la entrada del virus como la integración, se inhiben (Lee-Huang y cols., 2007a, 2007b, 2009). El HTy y sus derivados también son útiles, cuando se aplican tópicamente, como microbicidas para prevenir la infección por el virus, así como otras enfermedades de transmisión sexual causada por hongos, bacterias o virus (Gómez-Acebo y cols., 2011). Además, se ha descrito que el HTy inactiva el virus de la gripe A, lo que sugiere que el mecanismo del efecto antiviral del HTy podría requerir la presencia de una envoltura viral (Yamada y cols., 2009).

### **2.6.7. Actividad anticancerosa**

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la relación entre el consumo de aceite de oliva y la prevención del cáncer (Pérez-Jiménez y cols., 2005). Los compuestos antioxidantes suministrados mediante la dieta pueden disminuir el riesgo de padecer cáncer debido al hecho de que pueden reducir

al mínimo el daño sobre el ADN, la peroxidación de lípidos y la cantidad de EROs generadas (Manna y cols., 2005; Hillestrom y cols., 2006; Omar, 2010).

Existen más de 20 patentes y 38 artículos de revisión que tratan la relación entre el propio HTy y el cáncer (véase por ej.; Carrera-González y cols., 2013; Hu y cols., 2014). Así, se ha publicado que el HTy puede ejercer un efecto proapoptótico mediante la modulación de la expresión de genes implicados en la proliferación de células tumorales de promielocitos (células HL60) (Fabiani y cols., 2006, 2008, 2009, 2011) y, por otra parte, se ha demostrado que inhibe la proliferación de células MCF-7 de cáncer de mama (Siriani y cols., 2010; Bouallagui y cols., 2011; Bulotta y cols., 2011), células HT29 de carcinoma de colon (Guichard y cols., 2006), células de melanoma M14 (D'Angelo y cols., 2005) y células de próstata PC3 humanas (Quiles y cols., 2002).

#### **2.6.8. Actividad antidiabética**

El estrés oxidativo juega un papel importante en la patogenia de la resistencia a la insulina y se ha planteado la hipótesis de que los antioxidantes de la dieta podrían disminuir el riesgo de padecer diabetes. Así, estudios observacionales de tipo prospectivo y de intervención apoyan la relación inversa entre la dieta mediterránea y la resistencia a la insulina (Pauwels y cols., 2009).

Mediante estudios *in vivo* se evaluó el efecto de extractos ricos en HTy y oleuropeína administrados durante 4 semanas a ratas con diabetes inducida con alloxan. Los resultados confirmaron la capacidad de estos polifenoles para inhibir el estrés oxidativo (Jemai y cols., 2009). En otro estudio con animales de experimentación se demostró la capacidad hipoglucémica del HTy al reducir los niveles de glucosa en plasma de ratas diabéticas un 55% (Hamden y cols. 2009) y proteger las células pancreáticas frente al daño oxidativo evaluado mediante análisis histológico de los tejidos, mejorando así la secreción de insulina. En línea con estos resultados, el mismo grupo confirmó la acción inhibitoria del HTy sobre la toxicidad pancreática al observar un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes y disminución de los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y de LDH en el páncreas de

ratas diabéticas que ingirieron extractos de HTy durante dos meses (Hamden y cols., 2010).

Del mismo modo, los polifenoles presentes en extracto de hoja de olivo, oleuropeína e HTy como compuestos mayoritarios, revirtieron la inflamación crónica y el estrés oxidativo causantes de los síntomas cardiovasculares, hepáticos y metabólicos en un modelo de ratas obesas con diabetes inducida por la dieta, sin modificar la presión arterial (Poudyal y cols., 2010). Otros estudios basados en un tratamiento crónico mediante administración oral de HTy a ratas diabéticas mejoraron el efecto de la aspirina sobre la retinopatía diabética (De La Cruz y cols., 2010).

Todos estos resultados sugieren que los fenoles del aceite de oliva podrían prevenir las complicaciones de la diabetes asociadas con el estrés oxidativo.

### 2.7. Estrés oxidativo e ictus isquémico

Los RLs se relacionan directamente con múltiples entidades fisiopatológicas, ya que un desequilibrio en los sistemas redox intracelulares es algo tan frecuente como la propia existencia de la bioquímica humana.

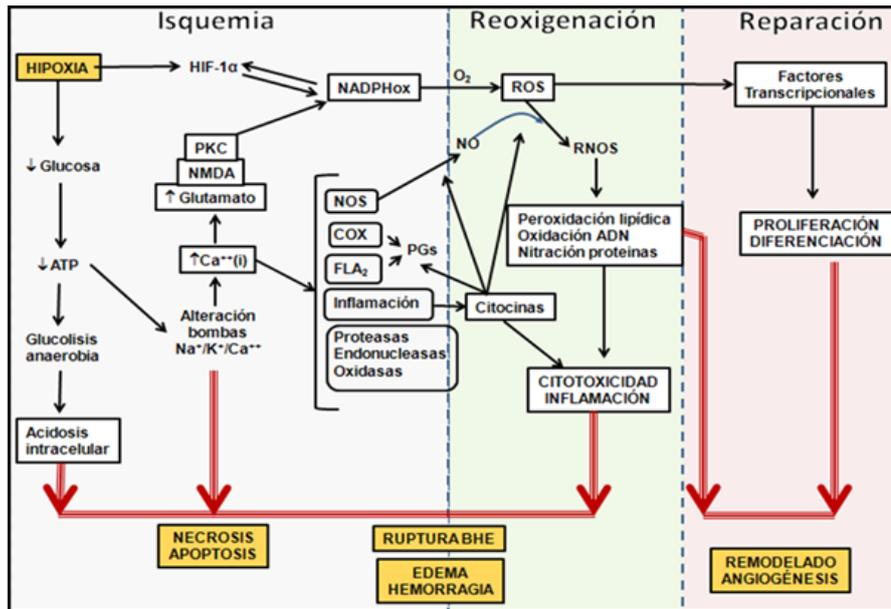
Posiblemente, el proceso de isquemia-reperfusión tisular sea el más directamente relacionado con la producción de RLs y el más estudiado en la bibliografía científica, también debido a que la patología vinculada a la isquemia-reperfusión presenta una alta prevalencia e incidencia en el mundo occidental. Tan sólo basta recordar que los procesos coronarios o los accidentes cerebrovasculares constituyen dos tercios de las muertes de origen cardiovascular en los países industrializados.

En la isquemia cerebral se produce un ostensible incremento de la producción de RLs, actuando éstos de forma lesiva sobre el tejido cerebral a través de diversos mecanismos bioquímicos, ya sea de forma directa, reaccionando con lípidos, proteínas o ácido nucleicos, o de forma indirecta, a través de un estímulo potente de la expresión y liberación de citocinas inflamatorias, tales como la interleucina 1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral, etc.

(Chen y cols., 2011; Haddad, 2003). Los RLs participan además en otras vías de daño celular postisquémico (Montaner, 2007), como es la disfunción mitocondrial, el estímulo de vías apoptóticas y la interrelación con la producción de óxido nítrico y posterior formación de peroxinitritos, lo cual amplifica la vía oxidativa de daño celular cerebral (Chen y cols., 2011; Kamat y cols., 2008).

Durante el proceso de hipoxia/isquemia se produce una disminución del flujo sanguíneo cerebral por debajo de 55-60 mL/100 g de tejido/min, originando una rápida disminución energética, alterando la función cerebral y desencadenando una compleja cascada de alteraciones bioquímicas (ver Esquema 2.12) que condicionan la muerte celular (Deseano-Estudillo y cols., 2003). Así, por diferentes mecanismos, se produce un aumento en la liberación de RLs. En situaciones de déficit de oxígeno, el ión superóxido es producido por la microglía activada, el ácido araquidónico es liberado desde la membrana celular por la fosfolipasa A<sub>2</sub> y se producen, colateralmente, hidroperóxidos lipídicos y radicales libres. En estas circunstancias, tiene también lugar la entrada masiva de Ca<sup>2+</sup>, como consecuencia de la despolarización de membrana, pudiéndose convertir la xantina deshidrogenasa en oxidasa, para utilizar oxígeno como receptor de electrones y liberar también el ión superóxido.

También se han descrito fuente de RLs como la propia óxido nítrico sintasa (NOS) que, en concentraciones subóptimas de L-arginina, puede producir el superóxido y el peróxido de hidrógeno. Por último, se admite que la disminución de la actividad citocromo C oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial producida tras la isquemia, puede llevar a la liberación de RLs. Para todos estos procesos es necesaria la presencia de oxígeno, lo cual nos lleva a pensar que estos fenómenos se producirían a partir del periodo de reperfusión/reoxigenación en el tejido dañado.



**Esquema 2.12**  
 Bioquímica del proceso de isquemia-reoxigenación (Ruiz, 2013)

Sea de una forma u otra, el estrés oxidativo (desbalance entre producción de RLs y defensa antioxidante tisular) juega un papel fundamental en el proceso de muerte neuronal en la isquemia cerebral. Todas estas evidencias han sido la base para postular la posible utilización de compuestos antioxidantes en la prevención del daño celular postisquémico cerebral (Kamat y cols., 2008; Chen y cols., 2011; Albarracín y cols., 2012). En modelos animales de isquemia-reperfusión cerebral se ha estudiado el posible efecto neuroprotector de algunos antioxidantes clásicos, tales como la vitamina E (Villalobos y cols., 1994; González-Correa y cols., 2006), donadores de glutatión como la S-adenosil-L-metionina (Villalobos y cols., 2000; De La Cruz y cols., 2002) o la N-acetil-cisteína (Pawlas, 2009), alopurinol (Ansari y cols., 2013), melatonina (Ozyener y cols., 2012) y diversos compuestos extraídos de las plantas (Albarracín y cols., 2012). En este sentido, también se ha estudiado la alimentación como base de antioxidantes con posible efecto neuroprotector, fundamentalmente, los polifenoles de frutas, como es el caso del resveratrol (Prabhakar, 2013) y, fundamentalmente, el AOV como tal (González-Correa y cols., 2007; Mohagheghi y cols., 2010) y sus componentes polifenólicos (Schaffer y cols., 2007; González-Correa y cols., 2008a,b). Asimismo, se ha demostrado el efecto neuroprotector de diversos derivados de HTy, como son los éteres derivados (Guerrero y cols., 2012; Muñoz-Marín y cols., 2012).

Todos estos estudios experimentales han dado sus frutos en el reciente ensayo PREDIMED (ver apartado 2.6.4) en el cual se demuestra una reducción de los accidentes cardiovasculares, entre los que se incluye el ictus cerebral (Estruch y cols., 2013). En este estudio se han analizado diversas variantes del ensayo principal, encontrando una relación con la disminución del estrés oxidativo y marcadores inflamatorios causados por la suplementación con AOV (Urpi-Sarda y cols., 2012; Zamora-Ros y cols., 2013).

## 2.8. Estrés oxidativo y enfermedad de Parkinson

El estado de estrés oxidativo juega igualmente un papel crucial en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas, tales como: Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (Mariani y cols., 2005, Hayashi, 2009). En todas estas condiciones se ha observado un incremento de marcadores de daño oxidativo, los cuales involucran oxidación de proteínas, lípidos, ADN e incluso de ARN. Una gran cantidad de evidencias indican que el incremento en la generación de EROs, un déficit en las defensas antioxidantes, así como la disminución en la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN, la proteólisis y la pérdida de regulación del sistema inmune, son factores que contribuyen primariamente al aumento de estrés oxidativo y conducen al daño cerebral progresivo (Mariani y cols., 2005; Zhou y cols., 2008, Hayashi, 2009).

Los mecanismos de óxido-reducción desempeñan un papel importante en la fisiopatología de la célula, y abarcan desde renovación de membranas, fenómenos plásticos celulares, supervivencia de células en sistema nervioso durante etapas embrionarias, mitosis, migración celular, síntesis y liberación de hormonas, aumento en la transcripción de citoquinas durante procesos inflamatorios, participación en señalización celular y mecanismos de segundos mensajeros (Smythies, 2000). Los RLs y las EROs son normalmente generados por el metabolismo celular para la obtención de energía (McCord, 2000; Halliwell y Gutteridge, 2007). Los sistemas antioxidantes eliminan las EROs para mantener un equilibrio de óxido-reducción en el organismo. En un estado de estrés oxidativo, se presenta un exceso de prooxidantes que no puede ser

contrarrestado por los sistemas antioxidantes endógenos. Numerosas evidencias científicas indican que, el incremento en la generación de EROs y un déficit en las defensas antioxidantes (Olanow y Arendash, 1994), así como la disminución en la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN y la proteólisis, además de pérdida de regulación del sistema inmune, son factores que contribuyen, fundamentalmente, al aumento de estrés oxidativo y llevan a daño cerebral progresivo.

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por una disminución de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y la concomitante pérdida de terminales nerviosos dopaminérgicos en el núcleo caudado-putamen, que es el área principal de proyección de las neuronas de la sustancia negra. En los últimos años, se han aportado nuevos conocimientos acerca de los mecanismos de neurodegeneración presentes en la EP. Las deficiencias en la función mitocondrial, el incremento del estrés oxidativo, apoptosis, excitotoxicidad e inflamación son parte de los procesos que eventualmente resultan en neurodegeneración (Dauer y Przedborski, 2003; Youdim y Buccafusco, 2005).

### **2.8.1. Estrés oxidativo mediado por hierro en la sustancia negra**

Existen cantidades altas de hierro ligadas al estrés oxidativo en la EP (Friedman y Galazka-Friedman, 2012). El incremento del hierro total no necesariamente implica un estado de estrés oxidativo, siempre y cuando existan proteínas que almacenan el hierro en su forma inerte, tales como la ferritina. La entrada y liberación de hierro por la ferritina ocurre cuando el hierro cambia a un estado más activo y participa en la reacción de Fenton para generar el radical hidroxilo. Algunos estudios han mostrado que el hierro se acumula en los astrocitos de la sustancia negra de ratas viejas, al mismo tiempo que existe un incremento en la tasa de Fe(III)/Fe(II) y una disminución de glutatión (Sayre y cols., 2001; Smeyne y Smeyne, 2013). Una interpretación es que el secuestro por la mitocondria del Fe(II) en la astrogliá de la sustancia negra, durante el envejecimiento, puede ser un factor que predispone el cerebro senescente a la EP (Sayre y cols., 2001).

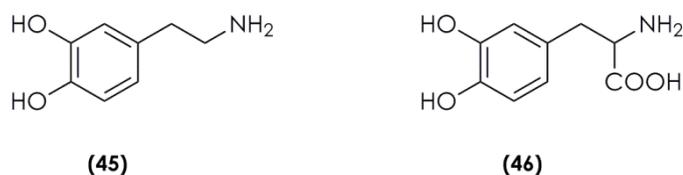
Además, existen evidencias de que la pérdida intracelular del balance redox resulta en una oxidación aberrante de dopamina en 6-hidroxdopamina, la cual, a su vez puede sufrir una auto-oxidación para formar quinonas y, simultáneamente, generar superóxido. Esta reacción en cascada, ya sea por sí misma, o amplificada por la generación de EROs, puede explicar la pérdida neuronal como resultado final (Angoa-Pérez y Rivas-Arancibia, 2007).

Además del hierro, la actividad de la monoamina oxidasa (MAO), enzima que participa en la ruta de la degradación de la dopamina (DA), también se ve incrementada en la EP. Ambos fenómenos están asociados con auto-oxidación de la DA y su desaminación por la MAO, lo cual resulta en la generación de EROs y RLs que promueven el inicio de estrés oxidativo para inducir neurodegeneración. Algunos autores han mostrado que los agentes quelantes de hierro, así como los inhibidores de la MAO, resultan protectores en algunos modelos de EP inducidos con la 6-hidroxdopamina y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (Youdim y cols., 2004; Youdim y Buccafusco, 2005; Gal y cols., 2006).

## 2.9. Nitrocatecoles y tratamiento de la enfermedad de Parkinson

El tratamiento sintomático clásico del Parkinson se ha centrado en recuperar los niveles de DA **(45)** (Esquema 2.13) a nivel cerebral y ha constado de varias etapas a lo largo de los años:

1) Inicialmente se describieron efectos antiparkinsonianos destacables con la administración prolongada de la 3,4-dihidroxifenil-L-alanina (L-DOPA o levodopa, **46**), un precursor de la dopamina (Cotzias, 1967). La L-DOPA se descarboxila por acción de la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AAD) a nivel cerebral produciendo dopamina **(45)**.



**Esquema 2.13**

Estructuras químicas de dopamina **(45)** y levodopa **(46)**

Un problema grave asociado inicialmente a esta terapia fue la dosis elevada (varios gramos) necesaria de levodopa (Barbeau, 1969), por la rápida descarboxilación que sufría a nivel periférico, antes de poder atravesar la barrera hematoencefálica, que limitaba su biodisponibilidad a nivel cerebral (1%).

2) La eficacia del tratamiento con levodopa se mejoró usando una combinación de ésta con un inhibidor de la AAD periférica (Cotzias, 1969). La mezcla de ambos compuestos incrementó su biodisponibilidad, disminuyendo la dosis hasta el 70% (Papavasiliou, 1972) así como los graves efectos secundarios a nivel periférico inducidos por la levodopa.

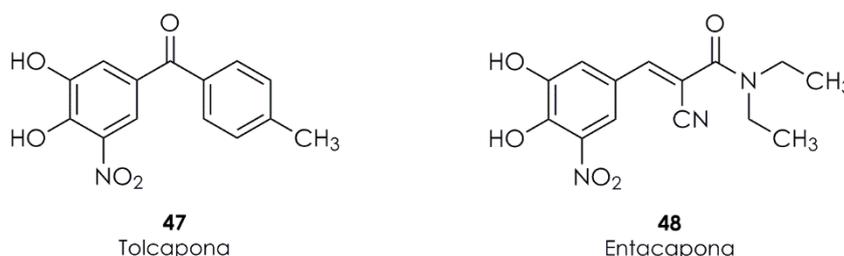
3) Incluso con la mezcla de levodopa y el inhibidor de la AAD periférica la biodisponibilidad seguía siendo muy pequeña, al alcanzar el cerebro sólo el 5-10% de levodopa por existir otras vías de metabolización. Entre éstas, destaca fundamentalmente la O-metilación mediada por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT), con producción de 3-O-metildopa, metabolito inactivo y que, además, compite con la L-DOPA por el sistema de transporte activo a través de la barrera hematoencefálica (Gomes, 1999). Además, la COMT está implicada en el catabolismo de la propia dopamina, catalizando la transferencia de un grupo metilo desde su cofactor S-adenosil-L-metionina (SAM) a los sustratos que contienen la unidad catecol (Axelrod y cols, 1958).

No es de extrañar por tanto que la inhibición de la actividad de la COMT se haya convertido en un nuevo objetivo en el tratamiento de la EP y que se esté dedicando un gran esfuerzo investigador en el desarrollo de inhibidores de la COMT para su utilización en una terapia combinada junto a L-DOPA y un inhibidor de la AAD (Bonifacio, 2007).

### **2.9.1. Nitrocatecoles como inhibidores de la COMT**

De hecho, dos compañías farmacéuticas, Hoffman LaRoche y Orion Pharma, comenzaron en los años 80, de forma independiente, a desarrollar estos inhibidores para su uso clínico. Se ensayaron miles de compuestos (Männistö, 1988; Borgulya, 1989) y, a finales de los años 90, registraron e

introdujeron en el mercado dos nuevos inhibidores de la COMT: tolcapona (**47**) (Hoffman LaRoche) y entacapona (**48**) (Orion Pharma) (Gordin, 2004) (Esquema 2.14). Ambos compuestos tienen un rasgo estructural común: presentan una unidad de nitrocatecol en su estructura, el cual, ha mostrado ser esencial para su actividad. Así, se ha demostrado que, mediante la utilización de un inhibidor de la COMT, se aumenta la biodisponibilidad de la L-DOPA hasta en un 60% (Sedek, 1997).



**Esquema 2.14**  
Estructuras químicas de tolcapona (**47**) y entacapona (**48**)

Farmacológicamente, la tolcapona se diferencia de la entacapona en que la primera presenta una actividad inhibidora de la COMT indiscriminada, tanto central como periférica, mientras que la entacapona es un inhibidor periférico selectivo. En ambas moléculas, el grupo nitro actúa estabilizando el complejo formado por la enzima y el inhibidor, además de reducir el carácter nucleófilo del grupo hidroxilo del catecol susceptible a la metilación (Männistö y Kaakkola, 1999).

Aunque ambos compuestos se han hecho un sólido hueco en la clínica para el tratamiento adyuvante con L-DOPA, la tolcapona se asoció a hepatotoxicidad (Assal y cols., 1998; Colissimo y cols., 1999). Habida cuenta de las limitaciones de este compuesto en su uso clínico, fue de especial interés demostrar la seguridad de la entacapona. Aunque no mostró actividad citotóxica, su baja lipofilia dificulta su paso a través de membranas (Forsberg y cols., 2005). Por otra parte, la entacapona presenta una baja vida media *in vivo* (Keranen y cols., 1994), lo que supone tratamientos en los pacientes con dosis altas y repetidas. Asimismo, la eficacia clínica de este compuesto ha sido recientemente cuestionada (Parashos y cols., 2004), siendo este aspecto decisivo para el cese de su utilización en la clínica.

## 2. Antecedentes

Por ello, numerosas investigaciones han concentrado su interés en obtener nuevos inhibidores de la COMT con perfil y vida media adecuados (Bäckström y cols., 2002; Pystynen y cols., 2002; Learmonth y cols., 2005; Learmonth y cols., 2007; Ahlamark y cols., 2007; Kiss y cols., 2010). Así, Learmonth y cols., (2005) sintetizaron una serie de compuestos con estructuras análogas a las anteriores. Estos compuestos nombrados BIA 3-202 (Learmonth y cols., 2002) y BIA 3-335 (Learmonth y cols., 2004) han resultado ser potentes inhibidores de larga duración y altamente selectivos de la actividad COMT periférica (Learmonth y cols., 2004). Además, a través de estudios de relación estructura-actividad (REA) y modelización molecular han evidenciado la gran influencia y selectividad que la longitud de la cadena lateral puede ejercer sobre la actividad de la enzima. De esta forma, concluyen que, aunque la unidad nitrocatecol es la responsable del anclaje del inhibidor al sitio activo de la enzima, se deben considerar las posibles influencias de la cadena lateral, ya que éstas podrían modular las propiedades fisicoquímicas y, en definitiva, la actividad de la molécula (Nissinen, 2010).

### 3. OBJETIVOS



En base a los antecedentes descritos con anterioridad sobre el HTy y sus derivados y teniendo en cuenta la actividad inhibidora de la COMT asociada a diversos nitrocatecoles en uso hoy día en la terapia combinada para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (EP), se planteó la síntesis de nitrocompuestos derivados de HTy, obtenido a partir de los residuos de la industria olivarera, con el fin de valorar su potencial terapéutico contra enfermedades neurodegenerativas.

Por ello, el objetivo global de este trabajo de investigación ha consistido en **la preparación de nuevos compuestos lipofílicos nitroderivados de HTy y la evaluación de su capacidad antioxidante *in vitro*, biodisponibilidad, metabolismo y actividad neuroprotectora en modelos experimentales de daño cerebral y enfermedad de Parkinson**. Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos específicos:

1. Preparación de nuevos ésteres y éteres lipofílicos nitroderivados de HTy y determinación estructural de los mismos.
2. Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de los ésteres y éteres nitroderivados de HTy sintetizados.
3. Estudio de la biodisponibilidad y metabolismo de nitrohidroxitirosol (NO<sub>2</sub>HTy), acetato de nitrohidroxitirosilo (NO<sub>2</sub>HTy-A) y etil éter de nitrohidroxitirosilo (NO<sub>2</sub>HTy-E) en líneas celulares Caco-2 y HepG2, como modelos de absorción intestinal y hepática humano, respectivamente.
4. Evaluación de la capacidad antioxidante y neuroprotectora de NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E en modelos experimentales de daño cerebral.
5. Estudio preclínico de la capacidad inhibidora de NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E sobre la actividad de la enzima COMT.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS



## 4.1. Síntesis y determinación estructural de las nuevas sustancias

### 4.1.1. Aparatos y procedimientos analíticos generales utilizados

Los instrumentos utilizados han sido los siguientes:

- Liofilizador Virtis Mod. BT 4K ZL.
- Equipos para la determinación del punto de fusión, Gallenkamp y SMP10 Melting Point.
- Espectrofotómetro de resonancia magnética nuclear (RMN) Bruker Avance-500 operando a 500,13 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 125,75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) con las señales residuales del disolvente a 2,49 ppm ( $^1\text{H}$ ) y 39,5 ppm ( $^{13}\text{C}$ ) en el caso de dimetilsulfóxido hexadeuterado ( $\text{DMSO-}d_6$ ) como referencias. Los espectros se han registrado a 303K y se han obtenido tanto espectros monodimensionales ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) como bidimensionales (COSY, NOESY, HSQC, HMBC) para la asignación de las señales observadas.
- Espectrómetro de masas (EM) Micromass AUTOSPECQ, de baja y alta resolución equipado con fuente de ionización química (CI) o ionización mediante bombardeo con átomos acelerados (FAB), para la determinación de los pesos moleculares y fórmulas moleculares.
- Cromatografía en capa fina (ccf): esta técnica se ha utilizado como método analítico cualitativo, empleando cromatofolios de aluminio (Merck, 60 F<sub>254</sub>) de un espesor de capa de 0,20 mm. Los reveladores usados fueron: luz ultravioleta de 254 nm y una disolución etanólica de ácido fosfomolibdico. En este último caso el revelado se ha realizado por inmersión de la placa en el revelador y posterior calentamiento en placa calefactora durante 1-2 minutos.
- Cromatografía en columna: este procedimiento se ha utilizado con fines

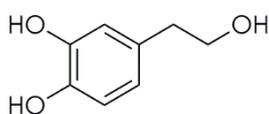
preparativos. El soporte empleado ha sido gel de sílice 60 (Merck) usando la técnica conocida como “*flash chromatography*”. El eluyente empleado se indica en cada caso. Las fracciones colectadas se analizaron por ccf.

##### 4.1.2. Sustancias comerciales empleadas

Las sustancias comerciales usadas han sido las siguientes:

- Acetato de etilo (Panreac)
- Acetona (Sigma-Aldrich)
- Ácido clorhídrico (Panreac)
- Ácido fosfomolibdico (Fluka)
- Ácido *p*-toluenosulfónico (pTsOH) (Sigma)
- Bromuro de bencilo (Fluka)
- Butanoato de metilo (Aldrich)
- Carbonato de potasio (Aldrich)
- Decanoato de metilo (Aldrich)
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (Panreac)
- Dimetil sulfóxido hexadeuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (Aldrich)
- Hexanoato de metilo (Aldrich)
- Hidróxido de potasio (Fluka)
- Laurato de metilo (Aldrich)
- Miristato de metilo (Aldrich)
- Nitrito de sodio (Riedel-de Haën)
- Octanoato de metilo (Aldrich)
- Paladio sobre carbón (C-Pd) (Aldrich)
- Palmitato de metilo (Aldrich)
- Sulfato de sodio anhidro (Panreac)
- Tetrahidrofurano (THF) (Scharlau)
- Yoduros de metilo, etilo, butilo, hexilo y octilo (Sigma-Aldrich)

#### 4.1.3. Aislamiento y purificación de hidroxitirosol (HTy) a partir de alperujo



El aislamiento del HTy (**2**) a partir de los residuos derivados de las aguas residuales procedentes del prensado de las aceitunas ha sido realizado mediante un procedimiento patentado por Fernández-Bolaños y cols. (2005). Brevemente, este procedimiento consiste en:

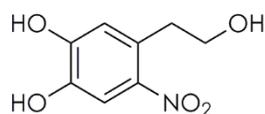
1) Un tratamiento previo del alperujo al vapor, por inyección de vapor de agua a presión durante un corto período de tiempo. De esta forma se consigue la solubilización del HTy y de otros muchos compuestos solubles en agua presentes en el alperujo.

2) Un sistema cromatográfico en dos fases, utilizándose en la primera columna una resina de intercambio iónico en ciertas condiciones, que permite la purificación parcial del HTy sin que éste sufra alteración alguna, tras su elución simplemente con agua, obteniéndose una disolución que contiene al menos el 85% del HTy contenido en la disolución introducida en la columna. La segunda columna se realiza utilizando una resina adsorbente polimérica XAD que permite la purificación total del HTy procedente de la etapa anterior, tras eluir con una mezcla de metanol o etanol/agua (30:70), obteniéndose una disolución que contiene al menos el 75% del HTy contenido en la fuente de HTy introducida en la primera etapa.

La disolución hidroalcohólica así obtenida fue amablemente suministrada por el grupo del Dr. Fernández-Bolaños con una pureza de entre el 85 y 96%. Para su posterior purificación se procedió según se describe a continuación:

Se liofilizó hasta sequedad empleándose para ello un equipo liofilizador Virtis y obteniéndose un residuo crudo con 3,5 g de HTy por litro. Este residuo crudo se cromatografió en columna usando como eluyente una mezcla de *t*-butilmetil éter/hexano (inicialmente 1:1 y después 2:1) para rendir el HTy completamente puro.

#### 4.1.4. Reacción de nitración. Procedimiento general



La síntesis de nitrohidroxitirosol (**49**) se llevó a cabo según el procedimiento sintético descrito por Napolitano y cols. (2004), con algunas modificaciones. 154 mg de HTy (**2**, 1 mmol) se adicionaron a 200 mL de tampón acetato 0,1 M (pH 3,8) seguido de 138 mg de nitrito de sodio (2 mmol). Tras 30 minutos de agitación a temperatura ambiente, la mezcla fue extraída con acetato de etilo (6 x 50 mL) y el residuo orgánico secado con sulfato de sodio anhidro y llevado a sequedad hasta lograr un producto amarillo (180 mg). El residuo resultante fue purificado por columna cromatográfica (acetato de etilo/hexano 3:1) obteniéndose 160,2 mg de nitrohidroxitirosol puro (**49**) como un sólido amarillo con rendimiento medio del 80,5%. **P.f.:** 197°C (desc.); **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 10,05 (bs, 2H, OH's fenólicos), 7,43 (s, 1H, *H*<sub>7</sub>), 6,75 (s, 1H, *H*<sub>4</sub>), 4,65 (bs, 1H, OH alcohólico), 3,56 (t, *J*=6,8 Hz, 2H, *H*<sub>1</sub>), 2,90 (t, 2H, *H*<sub>2</sub>); **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 150,9 (*C*<sub>5</sub>), 143,7 (*C*<sub>6</sub>), 139,7 (*C*<sub>8</sub>), 127,8 (*C*<sub>3</sub>), 118,5 (*C*<sub>4</sub>), 112,0 (*C*<sub>7</sub>), 61,0 (*C*<sub>1</sub>), 36,0 (*C*<sub>2</sub>); **MS-HR** (CI), *m/z* calculado para C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 200,0559. Encontrado: 200,0566 (3,5 ppm).

#### 4.1.5. Síntesis de las nuevas sustancias

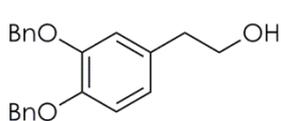
##### 4.1.5.1. Obtención de ésteres de nitrohidroxitirosilo. Procedimiento general

Una mezcla de nitrohidroxitirosol (**49**, 199 mg, 1 mmol) en el correspondiente metil o etil éster (acetato, butanoato, hexanoato, octanoato, decanoato, laurato, miristato o palmitato) (8 mL) y THF (8 mL) en presencia de ácido *p*-toluenosulfónico (10 mg) se calentó a 60-65°C durante el tiempo necesario (24-60h), hasta completar la reacción según la confirmación del análisis por ccf. El disolvente fue evaporado y el residuo resultante fue purificado por columna cromatográfica (hexano/éter dietílico en diversas proporciones) obteniéndose el correspondiente derivado acílico de nitrohidroxitirosol puro.

## 4.1.5.2. Síntesis de los éteres alquílicos de nitrohidroxitirosilo

Los éteres de HTy, sustratos necesarios para la posterior introducción del grupo nitro, se han obtenido mediante un esquema sintético conocido (Madrona y cols., 2009), que implica tres etapas:

## 4.1.5.2.1. Protección de los OH fenólicos. Reacción de dibencilación de HTy



Una disolución de HTy (**2**, 154 mg, 1 mmol) en acetona seca (20 mL) se hizo reaccionar con bromuro de bencilo (2,2 mmoles) en presencia de carbonato potásico (2 mmoles) a reflujo durante 24 horas. La suspensión obtenida se filtró, evaporó y el producto obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de *t*-butilmetil éter/hexano 1:2. Se obtuvo el derivado dibencilado de HTy puro (**26**) como un sólido blanco con rendimiento medio del 67%. **P.f.**: 55-57°C. Los datos espectroscópicos están de acuerdo con los recogidos en la bibliografía (Hamada y cols., 1985).

## 4.1.5.2.2. Reacción de alquilación

Una disolución del dibencil derivado de HTy (**26**, 334 mg, 1 mmol) en DMSO (15 mL) se hizo reaccionar con el yoduro de alquilo correspondiente (3 mmoles) en presencia de hidróxido de potasio recién pulverizado (336 mg, 6 mmoles). La mezcla se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente durante el tiempo necesario (aproximadamente 4 horas) confirmando que la reacción transcurrió completamente mediante ccf. La mezcla de reacción se procesó de la siguiente forma: se aciduló con disolución 3M de HCl (25 mL), y se extrajo con cloroformo (3 × 25 mL). Los extractos orgánicos recolectados se lavaron con una disolución al 2% de hidrógeno sulfito sódico (2 × 25 mL) y agua destilada (25 mL). Finalmente, se secaron, filtraron y evaporaron. El producto final fue purificado en cada caso mediante cromatografía en columna. De esta forma se prepararon los compuestos (**27-31**) (Madrona y cols., 2009).

## 4.1.5.2.3. Reacción de hidrogenolisis

El correspondiente éter protegido (**27-31**, 1mmol) se disolvió en THF destilado (20 mL) y se añadió un 10% (p/p) de carbón-paladio (C-Pd) como catalizador. La mezcla se hidrogenó a una presión de 4 bar con agitación

#### 4. Materiales y métodos

magnética a temperatura ambiente durante 24 horas. El final de la reacción se confirmó mediante ccf. Se filtró y lavó el catalizador a través de celita, se evaporó el disolvente a vacío y el producto obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice. De acuerdo a este procedimiento se obtuvieron finalmente los diferentes éteres de hidroxitirosilo (**36-40**) (Madrona y cols., 2009), sustratos necesarios para la etapa final de nitración.

##### 4.1.5.2.4. Reacción de nitración de los éteres de hidroxitirosilo

La nitración de los éteres de HTy fue llevada a cabo siguiendo el procedimiento general de nitración descrito en el apartado 4.1.4.

## 4.2. Estimación de la capacidad antioxidante *in vitro*

La capacidad antioxidante de todos los compuestos fenólicos puros en disolución sintetizados (serie acíclica y alquímica) se determinó mediante los métodos FRAP, ABTS y ORAC.

### 4.2.1. Capacidad reductora (Método FRAP)

El **ensayo FRAP** (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) se empleó para medir la capacidad reductora de los compuestos fenólicos por espectrofotometría mediante el método de Benzie y Strain (Benzie y Strain, 1996) con algunas modificaciones (Pulido y cols., 2000). Este método se basa en el aumento de la absorbancia del complejo tripiridiltriazina TPTZ-Fe (III) en presencia de agentes antioxidantes. A pH bajo, el complejo formado por (TPTZ) y Fe (III) es reducido por los antioxidantes a su forma ferrosa Fe (II), desarrollando un intenso color azul con una absorción máxima a 595 nm (pH 3,6; 37°C).

Se prepararon concentraciones conocidas de antioxidante utilizando como disolvente metanol. En la cubeta del espectrofotómetro se mezclaron 900 µL de reactivo FRAP con 90 µL de agua destilada y 30 µL de muestra. El reactivo FRAP que se preparó diariamente, contenía 25 mL de tampón acetato 0,3 M (pH 3,6), 2,5 mL de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y 2,5 mL de tricloruro de hierro hexahidratado 20 mM. Se leyeron las absorbancias durante

32 min cada 20 s a 595 nm y a una temperatura de 37 °C en un espectrofotómetro UV-Visible (Cary 50 BIO) con baño termostático. Paralelamente se efectuó un blanco mediante la mezcla en la cubeta de reacción de 900 µL de reactivo FRAP con 90 µL de agua destilada y 30 µL de disolvente metanol.

Los valores de absorbancia que se tuvieron en cuenta para llevar a cabo la determinación cuantitativa fueron los correspondientes a tiempo 30 min, siempre considerando la carencia de 20 s que existe entre las distintas cubetas de análisis.

Para calcular la capacidad reductora de una muestra, se tomó como referencia la recta de calibrado calculada para el patrón de Trolox entre 50 y 1000 µM en metanol. Los resultados se expresaron como Capacidad Antioxidante en Equivalentes de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (Trolox) (TEAC, mM) que se define como la concentración de antioxidante equivalente a la actividad mostrada por 1 mM de Trolox. Cada determinación se realizó por triplicado.

#### 4.2.2. Capacidad de secuestro de radicales libres

##### 4.2.2.1. Método ABTS

La capacidad de secuestro de radicales libres (*free radical scavenging capacity*) se determinó espectrofotométricamente por el método de decoloración de Re y cols., (1999), conocido por ABTS. Se basa en la disminución de la absorbancia a 730 nm y 30 °C del catión radical, ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>), un cromóforo verde-azulado que interacciona con especies donantes de hidrógeno o de electrones perdiendo color proporcionalmente. Se preparó una disolución 7mM del catión radical ABTS<sup>•+</sup> en frasco topacio, mediante la oxidación de 38,6 mg de ABTS en 10 mL de persulfato potásico 2,45 mM, en ausencia de luz y bajo agitación durante 12-16 h. El catión radical de ABTS<sup>•+</sup> generado se diluyó con metanol hasta obtener una absorbancia  $0,70 \pm 0,02$  a 730 nm y se mantuvo a 30 °C. Finalmente, se mezcló 3,9 mL de ABTS<sup>•+</sup> con 0,1 mL de muestra problema disuelta en metanol en la cubeta de reacción. Las muestras fueron agitadas

#### 4. Materiales y métodos

por inversión y se leyeron las absorbancias cada 20 s a 730 nm durante 6 min en un espectrofotómetro UV-Visible (Cary 50 BIO) con baño termostatzado. Cada determinación se realizó por triplicado.

Paralelamente se efectuó un blanco mediante la mezcla en la cubeta de reacción de 3,9 mL de ABTS<sup>•+</sup> y 0,1 mL de disolvente metanol. Se representó gráficamente el porcentaje de reducción del radical ABTS<sup>•+</sup> en función del tiempo y se obtuvo la función de la curva que se ajustó a la siguiente ecuación:  $y = a + bx^{0.5}$ ; donde "y" es el porcentaje de inhibición y "x" es el tiempo correspondiente a ese valor de porcentaje de inhibición. A continuación se calculó el área bajo la curva (ABC) entre 0 y 360 s mediante la correspondiente integral limitada.

Los resultados se expresaron como concentración antioxidante equivalente de Trolox (TEAC, mM). Para ello se realizó una recta de calibrado de Trolox en un rango de concentraciones conocido, comprendido entre 0,05 y 0,8 mM disuelto en metanol.

##### 4.2.2.2. Método ORAC (adaptación para compuestos lipofílicos)

La capacidad de secuestro de radicales libres fue determinada mediante el ensayo ORAC (*Oxygen Radical Scavenging Capacity*) (Huang y cols., 2002). Esta técnica se basa en la pérdida de fluorescencia de una sustancia de referencia (fluoresceína) tras la adición de un radical peroxilo, 2,2'-azobis(2-amidino-propano) diclorhidrato (AAPH), que actúa como iniciador de la reacción oxidativa. En presencia de un antioxidante, esta pérdida de fluorescencia es menor cuanto más capacidad antioxidante tenga el compuesto a evaluar.

Primeramente, se prepararon concentraciones conocidas de los antioxidantes de estudio en una disolución al 7% de  $\beta$ -ciclodextrina metilada randomizada (RMCD) en mezcla acetona/agua (1:1, v/v). Asimismo, se realizó una recta de calibrado de Trolox en un rango de concentraciones comprendido entre 6,25 y 100  $\mu$ M de Trolox en las mismas condiciones de disolución que las muestras problema. A continuación, se procedió a la preparación de la placa de 96 pocillos de color negro y fondo plano según se detalla en la tabla 4.1.

**Tabla 4.1**

Placa de 96 pocillos que incluye la recta de calibrado de Trolox en un rango de concentraciones 6,25-100  $\mu\text{M}$ , el blanco (B) y las diferentes muestras (M)

Trolox 6,25 $\mu\text{M}$	Trolox 25 $\mu\text{M}$	Trolox 75 $\mu\text{M}$	M 1	M3	M5	M7	M 9	M 11	M 13	M 15	B
Trolox 6,25 $\mu\text{M}$	Trolox 25 $\mu\text{M}$	Trolox 75 $\mu\text{M}$	M 1	M 3	M 5	M 7	M 9	M 11	M 13	M 15	B
Trolox 6,25 $\mu\text{M}$	Trolox 25 $\mu\text{M}$	Trolox 75 $\mu\text{M}$	M 1	M 3	M 5	M 7	M 9	M 11	M 13	M 15	B
Trolox 6,25 $\mu\text{M}$	Trolox 25 $\mu\text{M}$	Trolox 75 $\mu\text{M}$	M 1	M 3	M 5	M 7	M 9	M 11	M 13	M 15	B
Trolox 12,5 $\mu\text{M}$	Trolox 50 $\mu\text{M}$	Trolox 100 $\mu\text{M}$	M 2	M 4	M 6	M 8	M 10	M 12	M 14	M 16	B
Trolox 12,5 $\mu\text{M}$	Trolox 50 $\mu\text{M}$	Trolox 100 $\mu\text{M}$	M 2	M 4	M 6	M 8	M 10	M 12	M 14	M 16	B
Trolox 12,5 $\mu\text{M}$	Trolox 50 $\mu\text{M}$	Trolox 100 $\mu\text{M}$	M 2	M 4	M 6	M 8	M 10	M 12	M 14	M 16	B
Trolox 12,5 $\mu\text{M}$	Trolox 50 $\mu\text{M}$	Trolox 100 $\mu\text{M}$	M 2	M 4	M 6	M 8	M 10	M 12	M 14	M 16	B

En cada pocillo se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de fluoresceína de concentración  $8,5 \times 10^{-5}$  mM en tampón fosfato 75 mM (pH 7,4) y 25  $\mu\text{L}$  de Trolox o muestra a evaluar. El blanco se preparó con 150  $\mu\text{L}$  de fluoresceína y 25  $\mu\text{L}$  de la disolución acetona/agua (1:1, v/v) al 7% de RMCD. La placa así preparada se introdujo en el lector de multiplacas (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) previamente acondicionado a 37 °C. Seguidamente, se adicionó 30  $\mu\text{L}$  de radical AAPH de concentración 153 mM preparado en tampón fosfato 75 mM a pH 7,4 a cada pocillo para dar comienzo la reacción. Las lecturas se realizaron cada 2 min durante 120 min a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 528 nm. Cada determinación se realizó por cuadruplicado.

Al cabo de 120 min y finalizada la cinética se recogieron los valores resultantes del cálculo del área bajo la curva entre 0 y 120 min para cada concentración y se corrigieron con aquella obtenida para el blanco.

Los resultados se expresaron como concentración antioxidante equivalente de Trolox (TEAC, mM).

### 4.2.3. Análisis estadístico de los resultados

#### 4.2.3.1. Características muestrales

Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar de  $n$  determinaciones donde la  $n$  se especifica en cada experimento.

#### 4.2.3.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa estadístico SPSS (versión 20.0, SPSS, Inc., IBM Company).

Para valorar las diferencias entre las medias de los distintos compuestos observados en cada experimento se utilizó el análisis de la varianza de una vía (ANOVA), considerando un nivel de significación de  $p < 0,05$ . Previamente se aplicó el test de Levene para determinar la homogeneidad de la varianza de los datos obtenidos.

## 4.3. Evaluación de la biodisponibilidad a nivel intestinal y hepático

Los compuestos seleccionados para evaluar la biodisponibilidad a nivel intestinal y hepático fueron los siguientes: nitrohidroxitirosol ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ ), acetato de nitrohidroxitirosilo ( $\text{NO}_2\text{HTy-A}$ ), éter etílico de nitrohidroxitirosilo ( $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ ).

### 4.3.1. Transporte y metabolismo a nivel intestinal

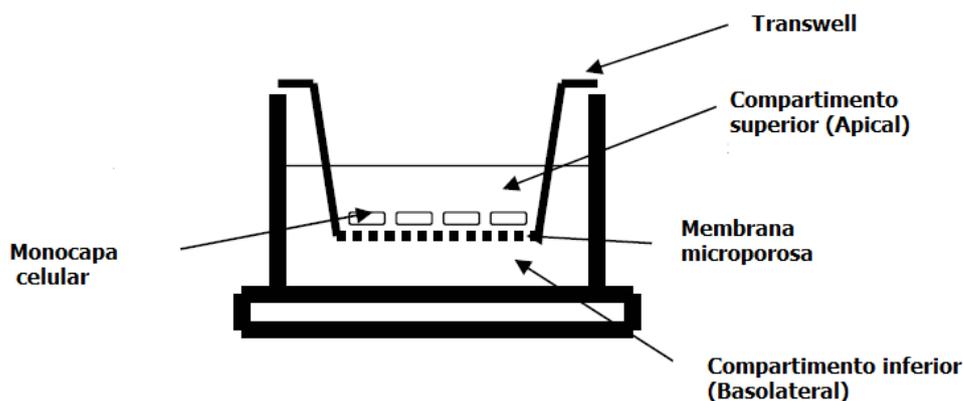
Para realizar el estudio de biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos objeto de estudio se seleccionó la línea celular humana Caco-2 (células de epitelio intestinal humano) como modelo experimental *in vitro*. Esta línea celular ha sido reconocida por la Food and Drug Administration de Estados Unidos (US, FDA, 2000) como modelo experimental para abordar estudios de metabolismo debido a sus características de permeabilidad y transporte de fármacos a través de la mucosa intestinal. Las células Caco-2 fueron suministradas por la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC)

a través del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada con un número de pase comprendido entre 48 y 52.

#### 4.3.1.1. Establecimiento del cultivo celular

El manejo de las células de carcinoma de colon humano (Caco-2) se llevó a cabo en una campana de flujo laminar en condiciones extremas de esterilidad. Las células se mantuvieron en placas de cultivo de 100 mm de diámetro con medio de cultivo Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM-21063), sin rojo fenol, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado térmicamente (45 min a 56°C), 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales (NEAA), 10.000 U/mL de penicilina y 1000 µg/mL de estreptomicina. El medio de cultivo se renovaba cada 2 días y las células se mantenían en atmosfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire a 37 °C.

Para la obtención de la monocapa celular de epitelio intestinal, las células se sembraron en cámaras bicamerales de 6 pocillos (Transwell Inserts, Corning Costar, NY) de 24 mm de diámetro del inserto, 4,67 cm<sup>2</sup> de superficie y 0,4 µm de tamaño de poro. Las células se sembraron a una densidad de 400.000 células por cm<sup>2</sup> adicionando 2 mL de medio en el compartimento basal y 2 mL en el apical. Las células alcanzaban la confluencia a las 48 h y a partir de ese momento comenzaba el proceso espontáneo de diferenciación que se estabilizaba a partir del día 21 posterior a la siembra. La monocapa diferenciada formaba un sistema de dos compartimentos, uno apical (Ap), que correspondía al lumen intestinal *in vivo*, y otro basolateral (BL), que correspondía al espacio intersticial en contacto con los capilares sanguíneos. Ambos se encontraban separados por el filtro que contenía la monocapa, tal y como se esquematiza en la Figura 4.1.



**Figura 4.1**  
Sistema de placa bicameral (Transwell) utilizado en los estudios *in vitro* de transporte y metabolismo de compuestos fenólicos

El seguimiento de la formación de la monocapa celular se realizó a través de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y del test Rojo Fenol.

#### 4.3.1.1.1. Determinación de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER)

La monitorización de la TEER ( $\Omega \text{ cm}^2$ ) es un indicador de la confluencia celular y de la integridad de la monocapa de las células cultivadas en las membranas microporosas. La TEER se determina con un voltímetro Millicell-ERS (Millipore Ltd., Watford, UK) que mide la resistencia de la monocapa en el lado apical de los insertos al paso de la corriente eléctrica.

Los valores de TEER se calcularon aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{TEER}_{\text{monocapa}} (\Omega \text{ cm}^2) = (\Omega_{\text{muestra}} - \Omega_{\text{blanco}}) \times 4,67 \text{ cm}^2$$

- Donde:
- $\Omega_{\text{muestra}}$  Medida de la resistencia de un pocillo con células (ohmios)
  - $\Omega_{\text{blanco}}$  Medida de la resistencia de un pocillo sin células o blanco (ohmios)
  - 4,67  $\text{cm}^2$  Superficie de la membrana sobre la que crecen las células

#### 4.3.1.1.2. Prueba del Rojo Fenol

La prueba del Rojo Fenol cuantifica el paso del colorante fenolsulfonftaleína (PSP) (Rojo Fenol) (Invitrogen, Paisley, U.K.) a través de la monocapa de células Caco-2, siendo la transferencia del mismo inversamente proporcional a la integridad de la monocapa.

Así, se añadió 100  $\mu\text{M}$  de PSP disuelto en medio DMEM-21063 sin suero al compartimento apical o basolateral mientras que en el lado contrario se completó con medio DMEM sin suero y colorante. Se mantuvieron las células en incubación durante 60 min a 37 °C en atmósfera controlada y al cabo de ese tiempo se determinó la absorbancia a 479 nm para cuantificar el contenido de colorante PSP en cada compartimento. Valores inferiores al 0,1% de colorante en el compartimento contrario al de incubación del colorante indicó un estado óptimo de la monocapa siendo adecuada para su uso en los experimentos de transporte y metabolismo.

Una vez transcurridos los 21 días y tras comprobar la integridad de la monocapa se procedió al desarrollo del experimento de transporte y metabolismo celular. Para ello, el día anterior del experimento, se retiró el medio de cultivo se lavó cada pocillo con tampón fosfato salino (PBS) y se cambió el medio de cultivo a medio sin suero para prevenir posibles interferencias con los componentes del suero.

#### 4.3.1.2. Evaluación del metabolismo en células Caco-2

Los compuestos fenólicos objeto de estudio se añadieron al compartimento apical (2 mL) a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  (0,1% DMSO) disueltos en medio DMEM-21063 sin suero y 300  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico como protector antioxidante. De igual forma, se adicionó 2 mL de medio DMEM-21063 sin suero con 300  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico al compartimento basolateral. Como referencia se incubaron las células que servirán de control en las mismas condiciones (medio DMEM-21063 sin suero con 0,1% DMSO y 300  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico) a excepción de los compuestos fenólicos. Las células control y tratadas se incubaron durante 1, 2 y 4 h a 37 °C en atmósfera controlada de 5%  $\text{CO}_2$  y 95% de aire.

Transcurridos los tiempos de incubación, se recogieron los medios presentes en los compartimentos apical y basolateral para su posterior almacenamiento a -20 °C hasta su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía líquida acoplada a detector de espectrometría de masas (LC-MS).

#### 4. Materiales y métodos

Por otro lado, se lavaron las células dos veces con PBS, se recogieron mediante raspado y se centrifugaron a 1250 rpm durante 5 min a 4 °C. El pellet resultante se resuspendió en 200 µL de PBS y se sonicó durante 10 min a temperatura ambiente para romper las membranas celulares y liberar los posibles metabolitos presentes en el interior de las células. Finalmente, y tras centrifugar las suspensiones celulares a 7000 rpm durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un eppendorf y se congeló a -20 °C hasta su análisis por HPLC y LC-MS. Cada condición se llevó a cabo por sextuplicado.

##### 4.3.1.3. Evaluación del transporte en células Caco-2

Para estudiar el transporte de los compuestos fenólicos en este modelo celular, se evaluó el sentido predominante de transferencia a través de la monocapa Caco-2 (apical a basolateral o basolateral a apical). Para ello, el transporte apical → basolateral se estudió mediante la adición de la solución fenólica disuelta en DMEM-21063 con 0,1% DMSO y 300 µM de ácido ascórbico en el compartimento apical, mientras que el transporte basolateral → apical se evaluó mediante la adición de la solución fenólica en el compartimento basolateral. Siempre se tomaron como referencia células tratadas con DMEM-21063 que contenían 0,1% de DMSO y 300 µM de ácido ascórbico. Al cabo de 1, 2 y 4 h de incubación, se recogieron los medios y se almacenaron a -20 °C. Cada condición se ensayó por sextuplicado.

Se determinó el coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ , cm/s) en ambas direcciones, tras 1 h de incubación de los compuestos con las células Caco-2 siguiendo la ecuación:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{V_R}{A \cdot C_0}$$

Donde:	$\frac{dQ}{dt}$	Velocidad de permeabilidad hacia el compartimento receptor (µM/s)
	$V_R$	Volumen del compartimento receptor (2 cm <sup>3</sup> )
	$A$	Área de la superficie de la membrana del Transwell (4,67 cm <sup>2</sup> )
	$C_0$	Concentración inicial en el compartimento donador (µM)

Además, calculando el cociente entre el  $P_{app_{AP-BL}}$  (sentido apical-basolateral) y el  $P_{app_{BL-AP}}$  (sentido basolateral-apical) se obtuvo el parámetro denominado índice de absorción (IA) ( $P_{app_{AP-BL}}/P_{app_{BL-AP}}$ ), que indicó el sentido preferente de transferencia a través de la monocapa por los compuestos fenólicos. Valores superiores a 1,0 indicaba un transporte mayoritariamente hacia la sangre portal mientras que valores inferiores a 1,0 indicaba un transporte de eflujo o hacia el lumen.

### 4.3.2. Biodisponibilidad y metabolismo a nivel hepático

El estudio de biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos objeto de estudio a nivel hepático se llevó a cabo en la línea de hepatoma humano HepG2 amablemente cedida por la Dra. Paloma Martín-Sanz del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Esta línea celular es considerada uno de los modelos experimentales más fiables que reproduce al hepatocito humano en cultivo.

#### 4.3.2.1. Establecimiento del cultivo celular

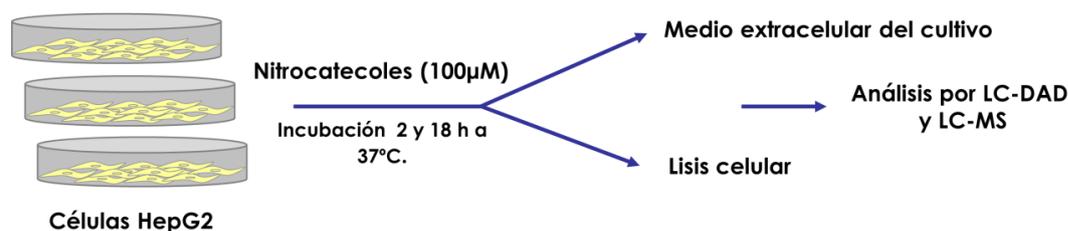
La manipulación de las células HepG2 se llevó a cabo en una campana de flujo laminar bajo condiciones de máxima esterilidad. Las células hepáticas HepG2 crecieron en placas de 100 mm de diámetro con 8 mL de medio DMEM F-12 suplementado con 2,5% de Suero Bovino Fetal (FBS) además de la mezcla de antibióticos compuesta por 100 mg/L de penicilina, gentamicina y estreptomycin. Las células se mantuvieron a 37 °C y atmósfera controlada con el 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire en un incubador. El medio de cultivo se renovaba cada dos días.

#### 4.3.2.2. Evaluación del metabolismo en células HepG2

Las células HepG2 se sembraban en placas de 60 mm y se dejaban crecer hasta que alcanzaban el 80% de confluencia, equivalente a una concentración de células por plato entre 2,5-3 x 10<sup>6</sup>. Los platos con esta confluencia de células se incubaban durante 2 y 18 h con medio DMEM F-12 libre de suero suplementado con la misma mezcla de antibióticos e implementado con los compuestos fenólicos a estudiar a una concentración

#### 4. Materiales y métodos

de 100  $\mu\text{M}$  (0,1% DMSO) y 300  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico, a un volumen final 3 mL. Cada condición se llevó a cabo por sextuplicado. Paralelamente se realizó un blanco con células incubadas con medio DMEM F-12 sin suero y 300  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico. Transcurrido los tiempos de incubación, se recogió el medio de cultivo de cada plato y se guardó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis por HPLC y LC-MS. Por otro lado, las células HepG2 se lavaron dos veces con PBS y se recogieron mediante raspado. Las células correspondientes a una misma condición experimental se juntaron en un eppendorf, se centrifugaron a 1250 rpm durante 5 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  PBS. A continuación, las células se sonicaron durante 7 min a temperatura ambiente para romper las membranas celulares y liberar los posibles fenoles y metabolitos presentes en el interior de la células, y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , recogiendo el sobrenadante que se guardó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis por HPLC y LC-MS. El proceso descrito se esquematiza a continuación en la Figura 4.2.



**Figura 4.2**

Procedimiento empleado para el estudio del metabolismo de nitroderivados de hidroxitirosol en células HepG2

#### 4.3.3. Identificación de metabolitos

Para la identificación de los metabolitos formados como consecuencia de la metabolización de los compuestos fenólicos tanto por las células intestinales (Caco-2) como hepáticas (HepG2) se utilizaron los siguientes procedimientos: reacciones de hidrólisis enzimática de los metabolitos con las enzimas  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa; reacciones de conjugación *in vitro* de estándares puros y análisis por HPLC y LC-MS.

##### 4.3.3.1. Reacción de hidrólisis enzimática

Las fracciones de medio de cultivo procedentes de la incubación de los compuestos fenólicos con las células Caco-2 y HepG2 se trataron con la

mezcla  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa (Manach y cols., 1997) para hidrolizar enzimáticamente los posibles metabolitos formados.

Para ello, 200  $\mu$ l de medio de cultivo procedente de la incubación de compuestos fenólicos con células Caco-2 o HepG2 se incubó con 20  $\mu$ l de ácido acético 0,58 N y 16  $\mu$ l de  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa (equivalente a  $5 \times 10^6$  U/L de  $\beta$ -glucuronidasa y  $2,5 \times 10^5$  U/L de sulfatasa, Sigma G0876). La mezcla se mantuvo en agitación moderada en un baño termostaticado a 37 °C durante 2 h. Paralelamente se desarrollaron tres blancos; el primero contenía 200  $\mu$ l de la muestra a tratar con metabolitos y ácido acético sin la enzima, el segundo presentó 200  $\mu$ l de agua con ácido acético y la enzima y el tercero contenía la enzima y el ácido acético con la muestra del medio a 0 h. A continuación se añadió 25  $\mu$ l de metanol para detener la reacción y precipitar las proteínas y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se conservó a -20 °C hasta su posterior análisis por HPLC y LC-MS. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

#### 4.3.3.2. Reacción de conjugación *in vitro*

Con el fin de obtener los principales metabolitos glucuronidados y metilados de los nitrocatecoles, se procedió a la síntesis enzimática de los mismos. La formación de derivados glucuronidados de los compuestos fenólicos tuvo lugar mediante la reacción del fenol con el ácido UDP-glucurónico como donador de ácido glucurónico en presencia de la enzima UDP-glucuronosiltransferasa (UGT) (Mateos y cols., 2005b), presente en la fracción microsomal de hígado de rata, obtenida siguiendo el procedimiento de Graham y colaboradores (Graham y cols., 1997) con algunas modificaciones (Mateos y cols., 2005b). Asimismo, la obtención de derivados metilados de los compuestos fenólicos se llevó a cabo mediante la reacción de los compuestos o-fenólicos con S-Adenosil-L-metionina (SAM) como donador de grupos metilos en presencia de la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT). Cada determinación se lleva a cabo por duplicado (Mateos y cols., 2005b).

#### 4. Materiales y métodos

##### 4.3.3.2.1. *Glucuronidación de compuestos fenólicos*

En un eppendorf se añadió un volumen de fracción microsomal de hígado de rata equivalente a 100  $\mu\text{g}$  de proteína (determinada por el método Bradford). A continuación, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de ácido UDP-glucurónico 50 mM y 50  $\mu\text{L}$  de compuesto fenólico de concentración 1 mM. Se añadió el tampón de reacción (Buffer A) hasta completar un volumen final de 500  $\mu\text{L}$ . El tampón Buffer A es una disolución que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), 1 mM de ditiotreitól (DTT) y 10 mM de cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ). La mezcla se mantuvo en agitación suave en baño de agua termostatizado a 37 °C durante 4 h. Paralelamente se desarrolló un blanco sin enzima constituido por 50  $\mu\text{L}$  de ácido UDP-glucurónico, 50  $\mu\text{L}$  de solución fenólica y el resto hasta 500  $\mu\text{L}$  con Buffer A. Transcurrida la incubación, la reacción se paró añadiendo 25  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 4 mM, se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 10 min y los sobrenadantes resultantes se recogieron y conservaron a -20 °C hasta su análisis por HPLC y LC-MS.

##### 4.3.3.2.2. *Metilación de compuestos fenólicos*

En un eppendorf se añadió 100  $\mu\text{L}$  de enzima COMT (1U/ $\mu\text{L}$ ), 50  $\mu\text{L}$  de solución fenólica y 100  $\mu\text{L}$  de tampón de reacción (Buffer M) y se mantuvo durante 5 minutos a 37 °C. A continuación se añadió 250  $\mu\text{L}$  de solución SAM 10 mM y se agitó con suavidad. Seguidamente, la mezcla se mantuvo en agitación moderada en baño de agua a 37 °C durante 4 horas. Las concentraciones finales de reacción quedaron de la siguiente manera: 5 mM SAM, 100  $\mu\text{M}$  compuesto fenólico y 100 unidades de enzima COMT. El tampón Buffer M es una disolución que contiene tampón fosfato 0,1 M (pH 7,9), 1 mM de ditiotreitól (DTT) y 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Paralelamente, se desarrolló un blanco sin la enzima COMT mezclando 50  $\mu\text{L}$  de solución fenólica, 200  $\mu\text{L}$  de Buffer M y 250  $\mu\text{L}$  de solución SAM. Transcurridas las 4 horas de incubación, se paró la reacción añadiendo 25  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 4 mM, se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 10 min y los sobrenadantes resultantes se recogieron y conservaron a -20 °C hasta su análisis por HPLC y LC-MS.

## 4.3.3.3. Análisis por HPLC

Todas las muestras de los medios de cultivo y los lisados celulares procedentes de los experimentos de biodisponibilidad intestinal y hepática de los compuestos fenólicos así como las muestras procedentes de las reacciones de hidrólisis enzimática y síntesis enzimática de derivados glucuronidados y metilados de los nitrocatecoles se analizaron en un equipo HPLC (Agilent Technologies, Serie 1200) equipado con detector de DAD, horno termostático e inyector automático con automuestreador también termostático. Se operó en un sistema de gradiente de eluyentes en fase reversa con una columna Superspher 100 RP18 (250 x 4µm) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) precedida por una precolumna (ODS RP 18). El caudal y temperatura de trabajo fue 1 mL/min y 37 °C, respectivamente y el volumen de inyección de 20 µL. La fase móvil consistió en un disolvente acuoso (A) formado por agua al 1% de ácido fórmico y disolvente orgánico (B) acetonitrilo. El gradiente de elución se estableció según las siguientes condiciones: de 95 a 90% de A en 5 minutos; 85% de A en 15 minutos; 80% de A en 5 minutos; 75% de A en 5 minutos; 70% de A en 5 minutos, retornando a las condiciones iniciales de 95% de A en 5 min y mantenimiento durante 5 min. La detección se llevó a cabo utilizando un detector DAD a la longitud de onda de 280 nm, siendo el tiempo de análisis de 45 min.

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos se realizaron curvas de calibrado de concentraciones conocidas (rango entre 0 y 100 µM) con estándares puros en el medio de cultivo sin suero. Los metabolitos se cuantificaron en base a la curva de calibrado de los respectivos precursores. En la Tabla 4.2 se recogen las rectas de calibrado obtenidas con las condiciones cromatográficas indicadas.

**Tabla 4.2**

Rectas de calibrado y coeficientes de determinación utilizados para la cuantificación de metabolitos generados en los estudios con los modelos celulares

Compuesto	Rango de concentraciones (µM)	Recta	Coef. Determinación
NO <sub>2</sub> HTy	1,25 - 100	Área =6,91*Conc+6,70	r <sup>2</sup> = 0,999
NO <sub>2</sub> HTy-A	1,25 - 100	Área =6,68*Conc+18,69	r <sup>2</sup> = 0,999
NO <sub>2</sub> HTy-E	1,25 - 100	Área =5,94*Conc+1,61	r <sup>2</sup> = 0,999

NO<sub>2</sub>HTy: Nitrohidroxitirosol; NO<sub>2</sub>HTy-A: Acetato de nitrohidroxitirosilo;  
NO<sub>2</sub>HTy-E: Eter etílico de nitrohidroxitirosilo

##### 4.3.3.4. Análisis por LC-MS

Para confirmar la identidad química de los metabolitos generados a partir del metabolismo intestinal y hepático de los compuestos fenólicos se llevó a cabo el análisis por LC-MS.

El equipo empleado consta de un HPLC-DAD (Agilent Technologies, Serie 1100) acoplado a un detector espectrómetro de masas simple cuadrupolo (Agilent Technologies, Serie 1100, Waldrom, Alemania). Para el análisis de masas se ajustó la fuente de ionización de electrospray (ESI-MS) a presión atmosférica operando en modo de ionización negativo, trabajando con un voltaje capilar de 3000 V, con nitrógeno como gas nebulizador a un flujo de 12 L/h y temperatura de secado de 300 °C. El espectro de masas se adquirió en un rango de masa comprendido entre 100 y 900 Da (1,5 s).

El resto de parámetros cromatográficos coinciden con las condiciones descritas en el apartado Análisis por HPLC (*apartado 4.3.3.3.*)

#### 4.4. Evaluación de la capacidad antioxidante y neuroprotectora de los nitroderivados de HTy en modelos experimentales de daño cerebral

##### 4.4.1. Animal de experimentación

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso comprendido entre 250-350 g que permanecieron bajo condiciones estándar de laboratorio, con un ciclo alternante de luz/oscuridad de 12 h, temperatura ambiente de 22°C y con libre acceso a comida y agua.

Los animales fueron estabulados de acuerdo con la normativa de uso, manejo y cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (EDL 2013/80847. BOE-A-2013-6271). El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Málaga.

#### 4.4.2. Tejido de estudio

El órgano objeto de estudio fue el cerebro. Para su obtención, los animales previamente anestesiados con pentobarbital sódico y diazepam, fueron decapitados. Posteriormente, se procedió a la disección de la piel y el tejido muscular de la región occipital para facilitar el decalotaje. Se realizaron dos osteotomías longitudinales sobre los huesos temporales hasta el frontal, levantándose con cuidado la escama resultante a fin de separar completamente el cerebro de la calota (Figura 4.3). Seguidamente se cortaron los tubérculos olfatorios y los pares craneales, siendo extraído el cerebro y el cerebelo del total del tejido. Finalmente, se aisló el cerebro medio que se mantuvo en condiciones de hipotermia inducida por hielo con el fin de retardar la autólisis del órgano.



**Figura 4.3**  
Imágenes del proceso de extracción del cerebro

#### 4.4.3. Compuestos de análisis

Los compuestos empleados fueron los siguientes: la serie de nitroderivados de HTy con estructura nitrocatecol (nitrohidroxitirosol ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ ), acetato de nitrohidroxitirosilo ( $\text{NO}_2\text{HTy-A}$ ) y éter etílico de nitrohidroxitirosilo ( $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ ) y la serie de precursores con estructura catecol (hidroxitirosol ( $\text{HTy}$ ), acetato de hidroxitirosilo ( $\text{HTy-A}$ ) y éter etílico de hidroxitirosilo ( $\text{HTy-E}$ ), a fin de evaluar de forma comparada el efecto neuroprotector.

Dado el carácter lipofílico de los compuestos nitroderivados y atendiendo a su baja solubilidad, se propuso el empleo de DMSO como disolvente orgánico para facilitar la disolución de los compuestos ensayados. Se realizó

#### 4. Materiales y métodos

un estudio concentración-efecto de DMSO a fin de definir el rango de concentraciones para su uso sin riesgo de toxicidad. Las concentraciones fueron expresadas en valores de porcentaje (0,5, 1, 5, 10). Se obtuvieron 6 secciones/tejido para el estudio de las condiciones anteriormente citadas, considerando también un control absoluto y un control DMSO. Finalmente, para todos los ensayos posteriores se utilizó como excipiente para la disolución DMSO al 1%.

##### **4.4.4. Diseño experimental**

Se realizaron dos tipos de estudio: *in vitro* y *ex vivo*.

###### *4.4.4.1. Experimentos in vitro*

Se constituyeron 6 grupos experimentales (atendiendo a los distintos compuestos utilizados) de 6 animales por grupo. Se emplearon concentraciones crecientes de los distintos compuestos para su incubación en tejido (0, 1, 5, 10, 50, 100 y 500  $\mu\text{M}$ )

###### *4.4.4.1.1. Estudios en tejido cerebral sin inducción química*

Muestras de tejido extraído del animal de experimentación las cuales constituyen las muestras control y sobre las que se realizarán las determinaciones bioquímicas pertinentes sin haber sometido el tejido previamente a inducción de daño alguno.

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando un total de 36 animales distribuidos en 6 grupos experimentales ( $n=6/\text{grupo}$  según compuesto fenólico), incubando el tejido obtenido (7 secciones/cerebro) en presencia de concentraciones crecientes de los distintos compuestos estudiados (0, 1, 5, 10, 50, 100 y 500  $\mu\text{M}$ ).

###### *4.4.4.1.2. Estudios en tejido cerebral con inducción química*

Muestras de tejido cerebral sobre las que se induce daño a través del empleo de las sustancias químicas tales como sales ferrosas y ácido ascórbico, maleato de dietilo (DEM) y *tert*-butilhidroxiperoxido (*t*-BOOH), todos ellos inductores de estrés oxidativo, para la valoración del estrés oxidativo (responsable del daño cerebral en este modelo):

1. Inducción con sales ferrosas y ácido ascórbico para la valoración de la peroxidación lipídica. Se emplearon concentraciones crecientes de los compuestos en estudio (1, 10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ). Para el estudio se llevó a cabo un  $n=36$ .

2. Incubación con DEM para la determinación de la actividad glutatión. Se emplearon concentraciones crecientes de los compuestos en estudio (1, 10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ). Para el estudio se llevó a cabo un  $n=36$ .

3. Incubación con *t*-BOOH para la determinación del contenido intracelular de radicales libres. Se emplearon concentraciones crecientes de los compuestos en estudio (1, 5, 10, 50, 100, 500  $\mu\text{M}$ ). Para el estudio se llevó a cabo un  $n=36$ .

En los tres modelos de inducción de daño químico fueron recolectadas muestras de tejido y sobrenadante para las determinaciones bioquímicas posteriores.

#### 4.4.4.1.3. Estudios en tejido cerebral sometido a un modelo experimental de hipoxia-reoxigenación

Muestras de tejido extraído del animal de experimentación sobre las cuales se induce un daño por hipoxia-reoxigenación (HR) del tejido a fin de reproducir *in vitro* las condiciones fisiológicas que acontecen durante un proceso isquémico cerebral. Para la realización de este estudio, se emplearon un total de 48 animales.

1. Estudio concentración-efecto del compuesto fenólico. Se emplearon 36 animales distribuidos en 6 grupos experimentales ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ ,  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$ ,  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ ,  $\text{HTy}$ ,  $\text{HTy-A}$ ,  $\text{HTy-E}$ ) ( $n=6/\text{grupo}$  según compuesto fenólico). Tras procesar los cortes cerebrales resultantes del cerebro medio (9 secciones/cerebro) se estableció una muestra de tejido control basal la cual no fue incubada y se incubaron las siete secciones restantes con concentraciones crecientes de cada uno de los compuestos a estudiar (0, 1, 5, 10, 50, 100 y 500  $\mu\text{M}$ ) disueltos en 1% DMSO. Estos estudios concentración-efecto estuvieron dirigidos a la obtención de la concentración óptima a emplear en posteriores ensayos de neuroprotección.

#### 4. Materiales y métodos

2. Estudio del efecto del compuesto fenólico a concentración 100  $\mu\text{M}$ . Se emplearon 24 animales distribuidos en 6 grupos experimentales (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A, NO<sub>2</sub>HTy-E, HTy, HTy-A, HTy-E) (n=6/grupo según compuesto fenólico) incubando el tejido en presencia del compuesto fenólico a concentración de 100  $\mu\text{M}$ .

Para todos los estudios, el tejido fue sometido al modelo experimental de HR y tras éste, se recogieron las muestras de sobrenadante y tejido para realizar las mediciones de las distintas variables.

##### 4.4.4.2. Modelo experimental de hipoxia-reoxigenación

Este modelo experimental de HR trata de reproducir, en condiciones *in vitro*, las distintas situaciones que suceden durante la isquemia-reperfusión en el proceso de ictus isquémico (ver Figura 4.4). Ha sido aplicado tanto al tejido de los animales tratados, como al de los no tratados, con los distintos compuestos de estudio.

Tras extraerse el cerebro, se introdujo en un tampón de disección: 10 mL (NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18 mM, glucosa 11 mM y sacarosa 200 Mm, pH: 7,4) sumergido en hielo y con perfusión continua de oxígeno.

A continuación, se procedió a obtener los cortes de unas 500 micras realizadas con vibratomo y se introdujeron durante 60 minutos en tampón de estabilización (igual al de disección pero sin sacarosa), a temperatura ambiente y sometido a una perfusión continua de oxígeno (utilizamos para cada fase donde sea necesaria una mezcla de O<sub>2</sub> al 95% y CO<sub>2</sub> al 5%, Alphagaz MIX. Air Liquide. España), etapa a la que llamamos de **estabilización**.

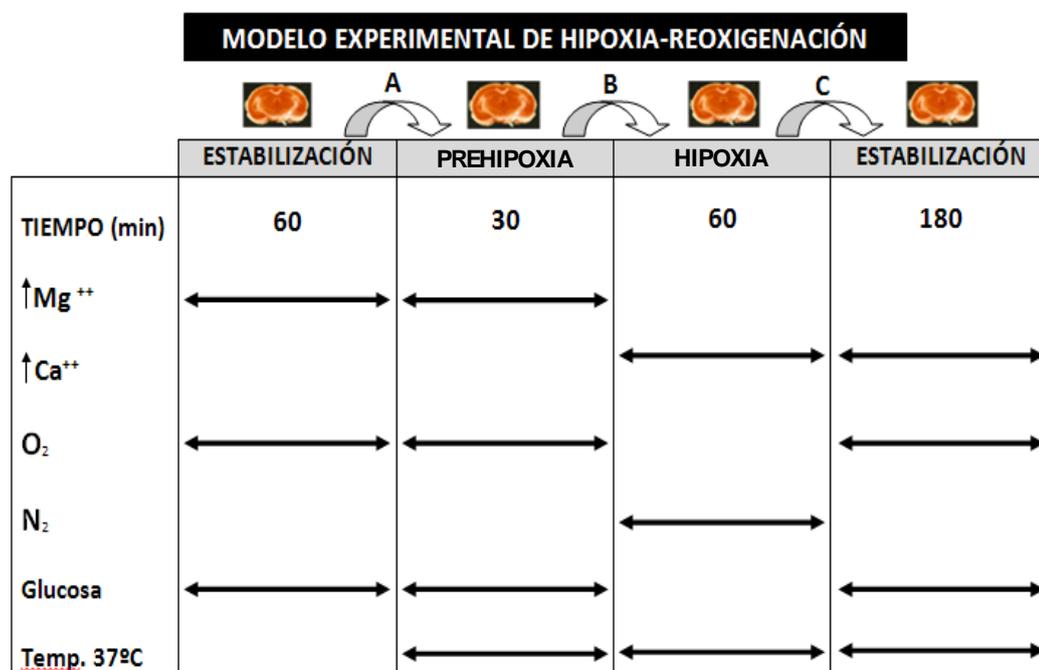
Seguidamente, iniciamos la etapa de **prehipoxia** consistente en sumergir los cortes en un tampón con la misma composición que en la fase anterior y con un burbujeo de oxígeno durante 30 minutos a una temperatura de 37°C (baño de bloque en seco para tubos "Multiplaces" con temperatura regulable de 10-200°C. Selecta. España).

A continuación, establecemos la etapa de **hipoxia** en la cual sometemos al tejido durante 60 minutos a una perfusión continua de nitrógeno (Alphagaz

N<sub>2</sub>. Air Liquide. España) en un tampón de hipoxia (NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,19 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18 Mm, pH: 7,4), a 37°C.

Por último, tiene lugar la etapa de **reoxigenación** que dura 180 minutos aunque metodológicamente la dividimos en tres fases de 60 minutos (R1, R2 y R3), utilizando un tampón de reoxigenación (igual al anterior añadiéndole glucosa 11 mM), a 37°C y con burbujeo continuo de oxígeno.

Para todos los casos, el tampón empleado en cada una de las etapas es sometido, previamente a su uso, a una oxigenación o nitrogenación (según proceda) continua durante 45 minutos.



**Figura 4.4**

Esquema del modelo experimental de hipoxia-reoxigenación

En los experimentos donde se utilizó tejido de **animales no tratados**, se añadieron los compuestos de estudio al inicio de cada una de las etapas del modelo. En todos ellos utilizamos la concentración necesaria para que al añadir 500 µl del preparado en 4,5 mL de tampón en cada uno de los inicios de las distintas fases del proceso de HR obtuviéramos la concentración deseada. En los experimentos donde se utilizó tejido de **animales tratados**, es decir, a los que se habían administrado vía orogástrica, al inicio de cada fase

#### 4. Materiales y métodos

del modelo no se añadió compuesto alguno, sólo 5 mL del tampón correspondiente.

Al final del proceso, se obtuvieron distintas muestras: por un lado, se recogió muestra de tampón (sobrenadante) al finalizar cada una de las fases intermedias del modelo así como tras la finalización del mismo y, por otro lado, se recogió el tejido cerebral al concluir el período de reoxigenación. Todas las muestras obtenidas se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para las posteriores determinaciones.

##### 4.4.4.3. Experimentos ex vivo

Los compuestos objeto de estudio fueron administrados mediante canulación orogástrica y tras el sacrificio del animal, el tejido fue sometido al modelo experimental de HR.

Se emplearon 42 animales distribuidos en 7 grupos ( $n=6$ ), estableciéndose un grupo control DMSO y 6 grupos experimentales a los que, mediante canulación orogástrica, se les administró una dosis de 20 mg/Kg animal/día de cada uno de los compuestos fenólicos durante un periodo consecutivo de 7 días. Tras ese periodo y una hora después de la última dosis administrada, se procedió al sacrificio de los animales para la obtención del tejido cerebral en un total de 5 secciones/cerebro que fueron sometidas al proceso de HR.

#### 4.4.5. Variables analíticas

##### 4.4.5.1. Variable principal: muerte celular cerebral

Se cuantificó la muerte celular de forma indirecta a través de la actividad enzimática lactato deshidrogenasa (LDH) en las muestras de sobrenadante tras la incubación en las distintas fases del proceso de HR.

##### 4.4.5.2. Variables predictoras: estrés oxidativo (peroxidación lipídica y defensa antioxidante)

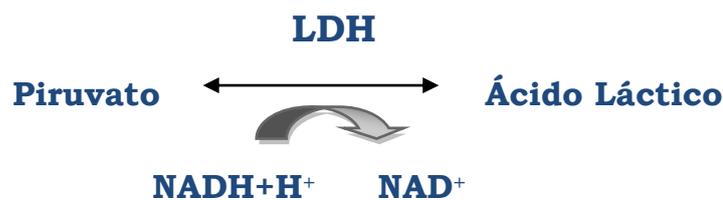
En las muestras de cerebro se valoró el daño oxidativo tisular a través de la determinación de la peroxidación lipídica de las membranas celulares, cuantificando los productos de la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS),

siendo su principal representante el malondialdehído (MDA). Asimismo, se estudió la capacidad defensiva antioxidante del tejido mediante la cuantificación del contenido celular de glutatión total, oxidado y reducido (GST, GSSG y GSH, respectivamente). Finalmente, se valoró el contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el tejido.

#### 4.4.6. Descripción de las técnicas analíticas

##### 4.4.6.1. Determinación de muerte celular: Actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH)

La enzima LDH cataliza la reducción del piruvato a lactato mediante la coenzima NADH y se utiliza como medida indirecta de muerte celular (Esquema 4.1).



**Esquema 4.1**

Esquema de la formación de ácido láctico a partir de piruvato

Para la medición de este parámetro se empleó el *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche Applied Science). Este test de inmunoensayo permite cuantificar la citotoxicidad/citolisis basados en la medida de la actividad LDH que se libera durante el daño celular, es decir, cuando se ha producido daño en la membrana plasmática. Para su realización, previamente se centrifugan las muestras obtenidas tras el proceso de HR (500  $\mu$ L de sobrenadante) a 250 xg durante 10 minutos (Eppendorf Centrifuge 5415D) y, a continuación, se procede a la realización del inmunoensayo con posterior lectura en un espectrofluorímetro. Los resultados obtenidos se ajustan al peso de las muestras de tejido correspondientes.

## 4. Materiales y métodos

### 4.4.6.2. Determinación del estatus oxidativo

#### 4.4.6.2.1. Determinación de la peroxidación lipídica

##### a) Obtención de fracciones enriquecidas de membranas

La obtención de las fracciones enriquecidas de membranas (fracción P<sub>2</sub>) se llevó a cabo mediante gradientes de centrifugación. Inicialmente los tejidos fueron pesados y diluidos en proporción 1:10 en una solución de incubación (NaCl 0,1 M, KCl 5x10<sup>-4</sup> M, CaCl<sub>2</sub> 3,1x10<sup>-3</sup> M, MgSO<sub>4</sub> 1x10<sup>-3</sup> M, Glucosa 4,9x10<sup>-3</sup> M, NaHCO<sub>3</sub> 2,4x10<sup>-2</sup> M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,5x10<sup>-4</sup> M, en agua bidestilada y desionizada), con Tris-HCl 50 mM y sacarosa 0,32 M, a pH 7,4. Cada fracción de tejido fue sometido a homogeneización manual y en condiciones de frío. Los distintos homogeneizados se repartieron posteriormente en tubos siliconados y se centrifugaron a 1000 xg durante 10 minutos a 4°C. Al finalizar la centrifugación se procedió a la extracción del sobrenadante mediante una pipeta pasteur (fracción S1), el cual fue transferido a tubos de ultracentrífuga, desechando de esta forma el pellet (fracción P1).

La fracción S1 fue centrifugada posteriormente a 10000 xg durante 20 minutos a 4°C, obteniéndose de nuevo un sobrenadante (fracción S2) que fue desechado y un pellet. Este segundo pellet o fracción P2 fue resuspendido mediante agitación continua hasta su total dilución en la solución de incubación sin sacarosa, en proporción 1:10 (peso/volumen) respecto al peso inicial. En todos los casos la dilución se realizó en proporción al peso original de cada una de las fracciones. Las diluciones obtenidas fueron congeladas a -80°C.

##### b) Determinación de los productos de reacción con ácido tiobarbitúrico (TBARS)

El fundamento de esta técnica se basa en la determinación indirecta de MDA como producto derivado del metabolismo del ácido araquidónico. La determinación de este metabolito del ácido araquidónico nos indica, de modo indirecto, los niveles de peroxidación alcanzados por un tejido y, aunque no es un metabolito específico del catabolismo peroxidativo, sí es un buen indicador aceptado por muchos autores del funcionalismo de esta vía oxidativa. Presenta también la ventaja de su carácter colorimétrico al

reaccionar con el ácido tiobarbitúrico, lo que nos permite cuantificar de forma fácil sus niveles en cualquier muestra determinando simplemente su absorbancia espectrofotométrica.

Para su determinación, se procedió a la dilución de las alícuotas de tejido mediante agitación en el tampón de incubación descrito para la obtención de la fracción P<sub>2</sub> con Tris-HCl 20 mM en proporción 1:2 (peso/volumen). Una vez obtenida la dilución de los tejidos, se repartieron las muestras en tubos de cristal en condiciones de frío. A las muestras problema se les añadió los inductores de la peroxidación lipídica, sulfato ferroso y ácido ascórbico (FeAs), ambos en un volumen de 50 µl, mientras que al control se le añadió el mismo volumen de agua (100 µl). El volumen final de las muestras fue en todos los casos el mismo. En los experimentos *in vitro* de tejido sometido previamente al modelo de HR, la inducción de daño químico con FeAs no fue necesaria. En estos casos se añadió el volumen correspondiente en agua destilada.

Esta fase de inducción de la peroxidación lipídica transcurre durante un período de tiempo de 45 minutos. Durante todo el proceso, los tubos fueron sometidos a agitación continua de 100 bats/min, a 37°C y protegidos de la luz.

Posteriormente se procedió a la incubación con el compuesto fenólico. Se añadieron 50 µL de concentración 100 µM, 100 µL de agua destilada o 150 µL en las muestras control. En aquellas muestras de tejido a las que ya previamente se les ha inducido el daño por hipoxia y han sido incubadas con el compuesto fenólico (tejido sometido a HR), el volumen añadido de agua destilada fue de 150 µL a fin de igualarlos.

Tras la incubación con el compuesto fenólico durante 30 minutos a 37 °C en agitación continua, se les añadió a las muestras un volumen de 500 µL de una solución de ácido tiobarbitúrico al 0,5% en ácido tricloroacético (20%). De esta forma, se produce una reacción colorimétrica que pone de manifiesto los TBARS formados en el paso anterior. La incubación con ácido tiobarbitúrico se llevó a cabo en un baño termostataado a 100°C durante 15 minutos, protegidas las muestras de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo con hielo. Las muestras fueron vertidas a tubos de plástico siliconados y centrifugadas a 2000 g durante 15 minutos a 4°C. Una vez obtenido el

#### 4. Materiales y métodos

sobrenadante, se procedió a su medición mediante un espectrofluorímetro a una longitud de onda de 532 nm en el espectro de luz visible.

El valor de la absorbancia resultante fue transformado en nmoles de TBARS mediante su interpolación en la curva de calibración estándar de TBARS realizada previamente. Para la obtención de ésta se empleó MDA-bis-dietilacetal en un rango de concentraciones de 0 a 100 nmol/L y siguiendo la metodología anteriormente descrita para la determinación de TBARS en los tejidos utilizando como sustituto del tejido, concentraciones crecientes de TBARS.

Los datos de la curva estándar de TBARS se analizaron mediante un programa de regresión no lineal y, sobre estos datos, se compararon las absorbancias de las muestras, obteniéndose la cantidad de TBARS de las mismas en nmol/mL.

Los valores de TBARS en nmoles producidos por las muestras se relacionaron posteriormente con los miligramos de proteínas existentes en ellas, expresando el índice de productos lipídicos reaccionantes con el ácido tiobarbitúrico en último término en nmoles de MDA/mg de proteínas.

##### c) Determinación de proteínas

Se empleó el mismo número de tubos como muestras se obtuvieron. A cada tubo se le adicionó 50  $\mu$ L de las muestras. El blanco del experimento se compuso de 50  $\mu$ L de disolución de NaCl 5N. A continuación se añadieron 2,5 mL del reactivo de Bradford (1000 mL: 0,1 g de Brilliant Blue. SIGMA Chemical Co. USA; 50 mL de Alcohol etílico al 96% (P/V). Probus; 100 mL de ácido ortofosfórico, Montplet & Esteban) a cada tubo y se agitaron. Tras un período de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se procedió a realizar la medición de las proteínas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

El valor de las proteínas se halló a través de la recta de calibrado correspondiente donde "y" representa la absorbancia de cada muestra y "x" la concentración de proteínas expresada en  $\mu$ g prot/100  $\mu$ L.

#### 4.4.6.2.2. Determinación de los niveles de glutatión

Para el desarrollo de esta experiencia se tomaron entre 50 y 90 mg de tejido, que una vez pesados, fueron homogeneizados manualmente en un volumen fijo de 1 mL de tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 8,0). Una vez obtenida una mezcla homogénea se añadió 0,25 mL de ácido fosfórico al 25%.

En los casos de incubación con algún compuesto (protocolo aplicable al tejido no sometido al proceso de HR) éste se hizo en un volumen de 50  $\mu$ L y en las mismas condiciones expresadas para la técnica de la peroxidación lipídica. La incorporación o no de DEM se hizo conjuntamente con el compuesto y durante el mismo periodo de tiempo y condiciones. Al finalizar dicha incubación se añadió el ácido ortofosfórico.

Esta solución contenida en el homogeneizador fue vertida en un tubo siliconado para proceder a su centrifugación, la cual se realizó a 13000 g durante 15 minutos a una temperatura de 4°C.

Durante la espera de la centrifugación, se elaboró una curva patrón de GSH a partir de una disolución 1 M (3,073 mg de GSH en 10 mL de tampón fosfato sódico), realizando sucesivas diluciones: 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024 y 1/2048. Todo ello se mantuvo en frío utilizando hielo triturado y agua.

Una vez finalizada la centrifugación se recogió del sobrenadante del cual 200  $\mu$ L se utilizaron para la determinación de GSSG y se le añadieron 8  $\mu$ L de 4-vinilpiridina (V3204, Sigma-Aldrich, USA) con objeto de bloquear todo paso de glutatión reducido a oxidado. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

Tras la incubación, se añadieron a los tubos 0,9 mL de tampón fosfato sódico a todos los tubos, 50  $\mu$ L de las muestras o bien, de la correspondiente concentración estándar, y por último, 50  $\mu$ L de o-phtalaldehído (P0657, Sigma-Aldrich, USA). Se agitaron y se incubaron durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura en el espectrofluorímetro, utilizando una longitud de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 440 nm,

#### 4. Materiales y métodos

obteniéndose los valores de la recta de calibrado, GST y GSSG. Se hallaron los valores de GSH a través de la siguiente ecuación:

$$\text{GSH} = \text{GST} - \text{GSSG}$$

Finalmente, se calculó el porcentaje de glutatión en su forma oxidada:

$$\% \text{ GSSG} = \frac{\text{GSSG} \times 100}{\text{GSH} + \text{GSSG}}$$

Los valores de glutatión fueron expresados en  $\mu\text{mol/g}$  de tejido.

##### 4.4.6.2.3. Determinación de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (EROs)

Tras el sacrificio animal, se obtuvieron las secciones necesarias del tejido de cerebro medio las cuales fueron sometidas a un flujo constante de oxígeno en incubación con un tampón de estabilización durante 10 minutos a 37°C. Tras este periodo, se recogió una muestra de tejido y sobrenadante para las determinaciones pertinentes.

Tras la primera fase de estabilización, las secciones de tejido restantes fueron incubadas con una solución 1mM de *t*-BOOH durante 30, 60, 90 y 120 minutos. El tejido una vez transcurrido el periodo de incubación fue procesado de inmediato mediante homogeneización manual empleando una dilución 1:10 del tejido en buffer tris-HCl 50 mM, pH 7,4. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Así, se obtuvo la fracción  $S_1$  sobre la cual se realizaron las determinaciones posteriores. Para la medición del contenido intracelular de radicales libres se empleó 100  $\mu\text{L}$  de las muestras obtenidas en cada uno de los tiempos de incubación a las que se adicionó 20  $\mu\text{L}$  de una solución 1 mM de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA, Sigma-Aldrich). Finalmente, para alcanzar un volumen final de 2 mL se añadieron 1880  $\mu\text{L}$  de buffer tris-HCl 10 mM, pH 7,4. Las muestras fueron incubadas en oscuridad a 37°C durante tiempos de 30 y 60 minutos obteniéndose valores de fluorescencia tras su medición en el espectrofluorímetro.

La determinación se llevó a cabo mediante lectura a dos longitudes de onda diferentes, 485 y 520 nm. Los datos fueron expresados como los valores

resultantes de la diferencia de ambas mediciones e interpolados en la recta de calibrado. Ésta fue hallada a partir de las concentraciones 0, 5, 10, 50, 100 y 300  $\mu\text{M}$  de una solución de diclorofluoresceína (DCFH, Sigma-Aldrich).

#### **4.4.7. Análisis estadístico de los resultados**

Los datos expresados en el texto, tablas y figuras recogidos en el apartado 5.4 representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) de los animales utilizados. La valoración estadística de dichos resultados se realizó mediante la utilización del paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI.

Las diferencias entre los distintos tratamientos con respecto al grupo control o niveles basales, según el estudio, se han establecido mediante la aplicación de test de ANOVA de una sola vía. En todos los casos, se ha asumido significación estadística con un valor de  $p < 0,05$ .

## 4.5. Estudio del efecto de los nitroderivados de HTy sobre la actividad COMT

### 4.5.1. Animal de experimentación

Los animales utilizados fueron ratas macho albino de la cepa Wistar, con un peso comprendido entre 270-320 g. Las ratas fueron mantenidas en condiciones de temperatura constante ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humedad relativa (60%), con ciclos alternos de luz y oscuridad de 12 horas y libre acceso de comida y agua. Los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con la normativa de la Unión Europea (2010/63/EU), siguiendo las bases reguladoras de España (BOE 34/11370-421, 2013) para el uso de animales de laboratorio y aprobado por el comité científico de la Universidad de Sevilla.

### 4.5.2. Compuestos de análisis

Los compuestos empleados como potenciales inhibidores de la COMT fueron los siguientes: hidroxitirosol (HTy), nitrohidroxitirosol ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ ), acetato de nitrohidroxitirosilo ( $\text{NO}_2\text{HTy-A}$ ), éter etílico de nitrohidroxitirosilo ( $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ ). También se empleó el inhibidor comercial 2'-fluoro-3,4-dihidroxi-5-nitrobenzofenona (Ro 41-0960) de Sigma Chemical Co., MO, USA.

Para el análisis de dopamina (DA) y sus metabolitos por HPLC se utilizaron los siguientes patrones: 3-hidroxi-tiramina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y ácido homovanílico (HVA), todos ellos suministrados por Sigma Chemical Co., MO, USA.

### 4.5.3. Tipos de estudio

Se realizaron dos tipos de experimentos: un primer estudio en muestras de tejido cerebral (cuerpo estriado) y un segundo en dializados obtenidos por la técnica de microdiálisis.

#### 4.5.3.1. Estudio en tejido

Los animales fueron divididos en dos grupos principales:

a) Tratamiento agudo: los animales recibieron una única dosis intraperitoneal (20 mg/Kg) entre las 10:00 y 11:00 a.m. y, dos horas después, fueron sacrificados.

b) Tratamiento crónico: los animales recibieron, diariamente, una dosis intraperitoneal de 20 mg/Kg durante cinco días consecutivos entre las 10:00 y 11:00 a.m. y fueron sacrificados el último día, dos horas después de la última administración.

Cada grupo principal de estudio fue dividido en seis subgrupos experimentales a los cuales se les administró de forma sistémica solución salina, el inhibidor comercial Ro 41-0960 y los compuestos fenólicos HTy, NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E.

Tras la decapitación, una vez extraído el cerebro, se diseccionó la región correspondiente al cuerpo estriado que, posteriormente, fue congelada en nitrógeno líquido y almacenada a -80°C hasta su análisis posterior (el tiempo total para el aislamiento del cerebro fue inferior a 3 minutos). Debido a que el tiempo transcurrido entre la decapitación y la extracción con ácido perclórico fue muy corto, los cambios *postmortem* de los niveles intracelulares de aminas biógenas y metabolitos no fueron significativos (Roubein y cols., 1979). Para su análisis, el tejido objeto de estudio fue pesado y, posteriormente, homogeneizado por sonicación sobre hielo en ácido perclórico 0,1 M (30 µL de ácido perclórico por cada mg de tejido fresco) con ayuda de un Hielscher UP100H Ultrasonic, Teltow, Germany. Las muestras fueron centrifugadas a 3.000 g, durante 15 minutos, a 4°C y el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de nylon de 0,22 µm de diámetro de poro (Spin-X centrifuge tube filter, Corning Incorporated, NY, USA). Las muestras fueron inyectadas a través de una válvula de inyección de alta presión (Rheodyne, CA, USA) empleando un 'loop' de 10µL.

#### 4. Materiales y métodos

##### 4.5.3.2. Estudio en dializado: microdiálisis

###### 4.5.3.2.1. Construcción de la cánula de microdiálisis

Las cánulas utilizadas en este estudio fueron en forma de 'l'-shaped (Santiago y Westerink, 1990). Están constituidas por un tubo de polietileno PE20 (d.i., 0,38 mm; d.e., 1,09 mm) de 1,5 cm al cual se le practica una fisura por la que se introduce un tubo capilar de sílice de 2,5 cm. Este capilar se recubre por un extremo con un tubo metálico de 25 ga de 1 cm de longitud y, por el otro, con la membrana dialítica tubular semipermeable de éster de celulosa saponificado (diámetro de poro 10.000 dalton) de 6 mm, sellada en su extremo distal con cianocrilato. La unión de la membrana dialítica, por un lado, y del tubo metálico, por otro lado, al PE20 se realiza con epoxi afirmando esta última zona con cemento dental. La longitud de la membrana dialítica libre (4 mm para las cánulas implantadas en el cuerpo estriado) se determina obturando el resto de la membrana con silicona.

###### 4.5.3.2.2. Procedimiento quirúrgico

Los animales fueron pesados y anestesiados con hidrato de cloral (400 mg/kg) por vía intraperitoneal. También se les aplicó localmente lidocaína (10% p/v en agua).

Se utilizó un aparato estereotáxico de David Kopf-6000 para roedores (Figura 4.5). Las coordenadas para la implantación estereotáxica de las cánulas, según el atlas de Paxinos y Watson, (1986) fueron: anterior +0,6 mm, lateral  $\pm$  2,8 mm, ventral 6,0 mm, desde el punto bregma y la duramadre, para ambos cuerpos estriados.

Una vez abierta la piel con un bisturí y colocadas sendas pinzas hemostáticas, se procedió a la localización del punto bregma. La cánula, sostenida en un brazo del estereotáxico, se situó justo en el punto bregma, se tomaron las coordenadas citadas anteriormente y se señalaron sobre el cráneo los puntos donde fueron implantadas ambas cánulas. Con ayuda de una fresa de corona esférica, conectada a un motor portafresas, se abrieron dos orificios para la colocación de sendos tornillos de fijación Micro-57. Asimismo, también se abrieron los orificios señalados para la implantación de las cánulas. A continuación, el extremo inferior de la cánula se situó sobre la

duramadre que quedó expuesta tras realizar el orificio. A partir de este punto, se introdujo la cánula a la profundidad debida según su implantación en el cuerpo estriado. El implante se fijó con cemento dental, englobando a los tornillos de fijación. Una vez fraguada la pasta, se retiraron las pinzas hemostáticas y se procedió a la sutura de la piel. Después de la operación las ratas fueron alojadas en jaulas de plástico de dimensiones 35 x 35 x 40 cm (Figura 4.5). Los experimentos se llevaron siempre a cabo 24-48 horas después de la implantación de la cánula. No es recomendable proseguir en los días posteriores por la aparición de gliosis alrededor de la cánula que disminuye su eficiencia.



**Figura 4.5**

Imágenes del proceso quirúrgico de implantación de la cánula de microdiálisis y mantenimiento del animal durante el protocolo experimental

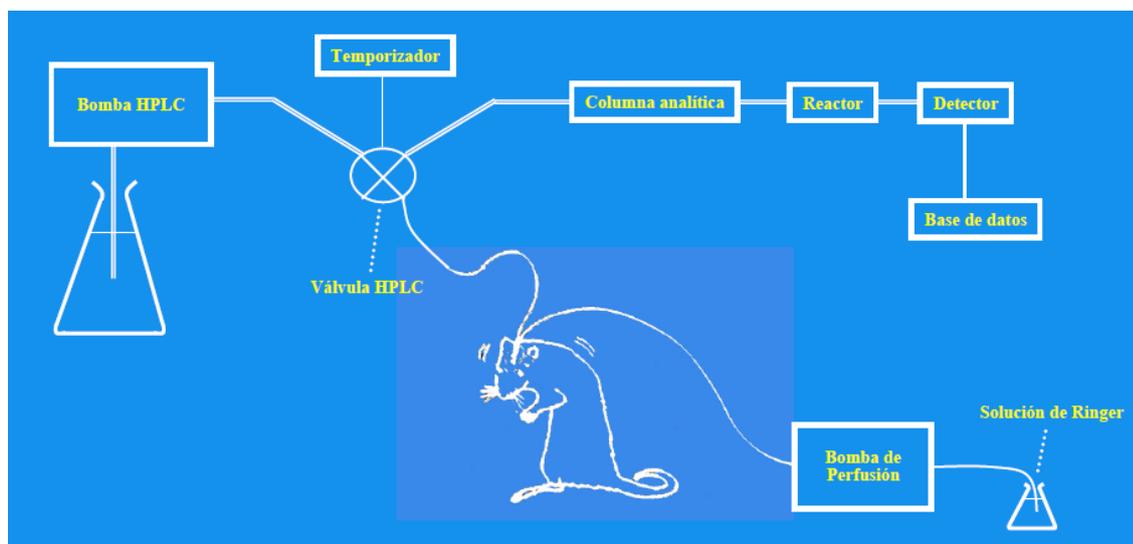
#### 4.5.3.2.3. Procedimiento de perfusión intracerebral. Microdiálisis

La perfusión intracerebral se realizó en el animal despierto, con libertad de movimiento, mediante un sistema "on-line" totalmente automático (Westerink y cols., 1987). La entrada de la cánula de diálisis se conectó a una bomba de perfusión (Harvard apparatus, mod. 22) y la salida a la válvula de inyección (Rheodyne 7000). Estas conexiones se hicieron con dos tubos de polietileno PE10 (d.i., 0,28 mm; d.e., 0,61 mm) de 40 cm de longitud. Las perfusiones se realizaron usando una solución Ringer a un flujo de 3  $\mu$ L/min (ver figura 4.6). La composición de la solución Ringer fue: NaCl, 140 mM; KCl, 4,0 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM; y MgCl<sub>2</sub>, 1,0 mM. Desde que las drogas incluidas en la solución Ringer son impulsadas por la bomba de perfusión hasta que la primera muestra con

#### 4. Materiales y métodos

drogas es inyectada en la columna hay un tiempo de retraso de 30 minutos. Los datos presentados en esta tesis han sido corregidos teniendo en cuenta este tiempo de retraso. Mediante un temporizador electrónico, la válvula de inyección se mantiene en la posición de carga durante 15 minutos en los que el 'loop' de 40  $\mu\text{L}$  se llena con el dializado. Entonces, la válvula cambia automáticamente a la posición de inyección durante 15 segundos. Este proceso se repite cada 15 minutos, que es el tiempo necesario para llevar a cabo un cromatograma completo.

El protocolo experimental de perfusión consistió en la perfusión de los compuestos tras hacer circular durante 1 hora solución Ringer a través de la cánula implantada. Después de la administración de los compuestos objeto de estudio se siguieron recogiendo muestras durante 2 horas y media.



**Figura 4.6**  
Protocolo experimental

##### 4.5.3.2.4. Cuantificación de los metabolitos de DA por HPLC

Los niveles de DA y sus metabolitos fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución y detección electroquímica (HPLC-ED), usando un electrodo de carbón vítreo (DECADE II, ANTEC LEYDEN, The Netherlands) ajustado a 650 mV para la determinación en tejido en muestras de dializado. Se utilizó una bomba Merck L-6200. La columna analítica utilizada fue una Merck Lichrocart de fase reversa con relleno Lichrospher C<sub>18</sub> de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y de dimensiones 125 x 4 mm.

La composición de la fase móvil fue la siguiente: acetato sódico 0,05 M (Carlo Erba Reagenti), ácido octanosulfónico 0,4 mM (Janssen Chimica), ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0,3 mM (Sigma Chemical Co.) y 70 mL de metanol (Merck), en un volumen final de 2 litros, ajustándose el pH a 4,1 con ácido acético. El agua utilizada fue desionizada (Milli-Q Reference, Millipore). La fase móvil se filtró a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro mediante vacío y se desgasificó por ultrasonido para eliminar las pequeñas burbujas de aire que puedan interferir en el análisis. Los análisis se llevaron a cabo, isocráticamente, a temperatura ambiente y a un flujo de 1,0 mL/min, en ambas determinaciones de tejido y dializado.

La concentración de DA, DOPAC, 5-HIAA y HVA se calculó mediante la inyección en el HPLC de un patrón puro, el cual se preparó en una solución de ácido fórmico al 0,05% con EDTA y se conservó a 4°C hasta el momento de su utilización (máximo 1 semana).

Los niveles intra- y extracelulares de DA, DOPAC, 5-HIAA y HVA se identificaron y cuantificaron comparando el tiempo de retención (TR) y área de sus picos con los de los patrones puros de concentración conocida. Los niveles de DA y sus metabolitos fueron calculados con ayuda de eDAQ PowerChrom 280 software.

#### 4.5.4. Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis fue empleado el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EEM. En el estudio en tejido, las medias de las concentraciones de DA y sus metabolitos en los tratamientos agudo y crónico fueron comparadas por ANOVA de una sola vía. Cuando el valor de P fue mayor del 95% del nivel de confianza, se realizó la comparación de las medias usando el test LSD para post hoc múltiple range comparisons. Un nivel de alfa menor de 0,05 fue considerado como una diferencia significativa. El test t de student se usó para comparar los valores entre diferentes tratamientos al mismo tiempo de recolección de muestra de dializado.



## 5. RESULTADOS

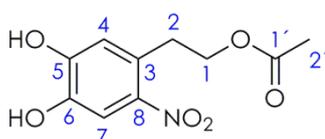


## 5.1. Síntesis y determinación estructural de las nuevas sustancias

### 5.1.1. Preparación y caracterización de ésteres de nitrohidroxitirosilo

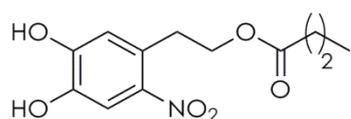
Siguiendo el procedimiento descrito en los apartados 4.1.4. y 4.1.5. se han preparado los siguientes compuestos:

#### 5.1.1.1. Acetato de nitrohidroxitirosilo (**50**)



Se preparó a partir de **49** usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla de dietil éter/hexano 5:1. Se obtuvo el producto puro como un sólido blanco (96%). **P.f.:** 107-109°C; **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 10,11 (bs, 2H, 2 OH fenólicos), 7,46 (s, 1H, *H*<sub>7</sub>), 6,74 (s, 1H, *H*<sub>4</sub>), 4,18 (t, *J*=6,6 Hz, 2H, *H*<sub>1</sub>), 3,06 (t, 2H, *H*<sub>2</sub>), 1,94 (s, 3H, *H*<sub>2'</sub>); **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 170,2 (*C*<sub>1'</sub>), 151,2 (*C*<sub>5</sub>), 144,2 (*C*<sub>6</sub>), 139,8 (*C*<sub>8</sub>), 126,2 (*C*<sub>3</sub>), 118,4 (*C*<sub>4</sub>), 112,2 (*C*<sub>7</sub>), 63,4 (*C*<sub>1</sub>), 31,8 (*C*<sub>2</sub>), 20,6 (*C*<sub>2'</sub>); **MS-HR** (CI), *m/z* calculado para C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>6</sub> [M]<sup>+</sup> 241,0586. Encontrado: 241,0591 (1,9 ppm).

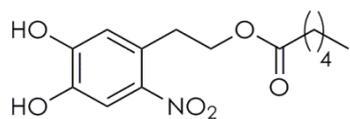
#### 5.1.1.2. Butirato de nitrohidroxitirosilo (**51**)



Se preparó a partir de **49** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla de dietil éter/hexano 3:1. Se obtuvo el producto puro como un sirupo (70%). **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 10,34 y 9,85 (2 bs, 2H, 2 OH fenólicos), 7,46 (s, 1H, *H*<sub>7</sub>), 6,73 (s, 1H, *H*<sub>4</sub>), 4,20 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, *H*<sub>1</sub>), 3,07 (t, 2H, *H*<sub>2</sub>), 2,20 (t, *J*=7,2 Hz, 2H, *H*<sub>2'</sub>), 1,48 (m, 2H, *H*<sub>3'</sub>), 0,81 (t, *J*=7,4 Hz, 3H, *H*<sub>4'</sub>); **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 172,5 (*C*<sub>1'</sub>), 151,2 (*C*<sub>5</sub>), 144,2 (*C*<sub>6</sub>), 139,7 (*C*<sub>8</sub>), 126,3 (*C*<sub>3</sub>), 118,5 (*C*<sub>4</sub>), 112,2 (*C*<sub>7</sub>), 63,2 (*C*<sub>1</sub>), 35,3 (*C*<sub>2'</sub>), 31,9 (*C*<sub>2</sub>), 17,8 (*C*<sub>3'</sub>), 13,3 (*C*<sub>4'</sub>); **MS-HR** (FAB) *m/z* calculado para C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 292,0797. Encontrado: 292,0796 (0,4 ppm).

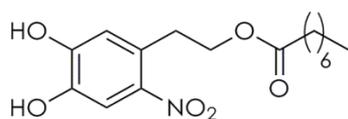
## 5. Resultados

### 5.1.1.3. Hexanoato de nitrohidroxitirosilo (**52**)



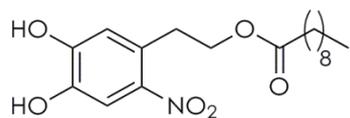
Seguendo el procedimiento general anteriormente descrito se preparó a partir de **49** usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla de dietil éter/hexano 5:1. El producto puro se obtuvo como un sirupo (80%). **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 10,10 (bs, 2H, 2 OH fenólicos), 7,46 (s, 1H, *H*<sub>7</sub>), 6,73 (s, 1H, *H*<sub>4</sub>), 4,20 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, *H*<sub>1</sub>), 3,07 (t, 2H, *H*<sub>2</sub>), 2,20 (t, *J*=7,4 Hz, 2H, *H*<sub>2'</sub>), 1,45 (m, 2H, *H*<sub>3'</sub>), 1,21 (m, 4H, *H*<sub>4'</sub> y *H*<sub>5'</sub>), 0,82 (t, *J*=7,4 Hz, 3H, *H*<sub>6'</sub>); **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 172,7 (*C*<sub>1'</sub>), 151,2 (*C*<sub>5</sub>), 144,1 (*C*<sub>6</sub>), 139,7 (*C*<sub>8</sub>), 126,2 (*C*<sub>3</sub>), 118,4 (*C*<sub>4</sub>), 112,2 (*C*<sub>7</sub>), 63,2 (*C*<sub>1</sub>), 33,4 (*C*<sub>2'</sub>), 31,8 (*C*<sub>2</sub>), 30,5 (*C*<sub>4'</sub>), 24,0 (*C*<sub>3'</sub>), 21,7 (*C*<sub>5'</sub>), 13,7 (*C*<sub>6'</sub>); **MS-HR** (FAB) *m/z* calculado para C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 320,1110. Encontrado: 320,1107 (1,0 ppm).

### 5.1.1.4. Octanoato de nitrohidroxitirosilo (**53**)



Se preparó a partir de **49** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla de dietil éter/hexano 5:1. Se obtuvo el producto puro como un líquido incoloro (72%). **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 10,10 (bs, 2H, 2 OH fenólicos), 7,47 (s, 1H, *H*<sub>7</sub>), 6,73 (s, 1H, *H*<sub>4</sub>), 4,20 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, *H*<sub>1</sub>), 3,07 (t, 2H, *H*<sub>2</sub>), 2,20 (t, *J*=7,4 Hz, 2H, *H*<sub>2'</sub>), 1,44 (m, 2H, *H*<sub>3'</sub>), 1,21 (m, 8H, *H*<sub>4'</sub>-*H*<sub>7'</sub>), 0,82 (t, *J*=7,4 Hz, 3H, *H*<sub>8'</sub>); **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 172,7 (*C*<sub>1'</sub>), 151,2 (*C*<sub>5</sub>), 144,2 (*C*<sub>6</sub>), 139,7 (*C*<sub>8</sub>), 126,3 (*C*<sub>3</sub>), 118,4 (*C*<sub>4</sub>), 112,2 (*C*<sub>7</sub>), 63,2 (*C*<sub>1</sub>), 33,5 (*C*<sub>2'</sub>), 31,9 (*C*<sub>2</sub>), 31,1 (*C*<sub>6'</sub>), 28,4 - 28,3 (*C*<sub>4'</sub> y *C*<sub>5'</sub>), 24,4 (*C*<sub>3'</sub>), 22,0 (*C*<sub>7'</sub>), 13,9 (*C*<sub>8'</sub>); **MS-HR** (CI) *m/z* calculado para C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 326,1604. Encontrado: 326,1601 (0,8 ppm).

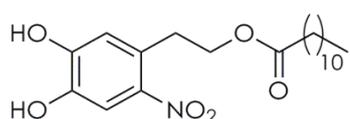
### 5.1.1.5. Decanoato de nitrohidroxitirosilo (**54**)



Se preparó a partir de **49** usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla de dietil éter/hexano 1:1. Se obtuvo el producto puro como un sólido blanco (81%). **P.f.:** 65-66°C; **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 10,33 y 9,84 (2 bs, 2H, 2 OH fenólicos), 7,47 (s, 1H, *H*<sub>7</sub>), 6,74 (s, 1H, *H*<sub>4</sub>), 4,20 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, *H*<sub>1</sub>), 3,07 (t, 2H, *H*<sub>2</sub>), 2,21 (t, *J*=7,4 Hz, 2H, *H*<sub>2'</sub>), 1,45 (m, 2H, *H*<sub>3'</sub>), 1,22 (m, 12H, *H*<sub>4'</sub>-*H*<sub>9'</sub>), 0,84 (t, *J*=6,9 Hz, 3H, *H*<sub>10'</sub>); **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm

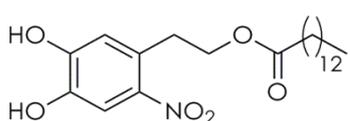
172,6 ( $C_{1'}$ ), 151,1 ( $C_5$ ), 144,1 ( $C_6$ ), 139,7 ( $C_8$ ), 126,2 ( $C_3$ ), 118,4 ( $C_4$ ), 112,2 ( $C_7$ ), 63,2 ( $C_1$ ), 33,4 ( $C_{2'}$ ), 31,8 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{8'}$ ), 28,7-28,3 ( $C_{4'}$ - $C_{7'}$ ), 24,2 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{9'}$ ), 13,8 ( $C_{10'}$ ); **MS-HR** (FAB)  $m/z$  calculado para  $C_{18}H_{27}NO_6Na$   $[M+Na]^+$  376,1736. Encontrado: 376,1736 (0,0 ppm).

#### 5.1.1.6. Laurato de nitrohidroxitirosilo (**55**)



Seguendo el procedimiento general anteriormente descrito se preparó a partir de **49** usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla de dietil éter/hexano 2:1. Se obtuvo el producto puro como un sólido blanco (58%). **P.f.:** 76-77°C;  **$^1H$ -RMN** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 10,10 (bs, 2H, 2 OH fenólicos), 7,47 (s, 1H,  $H_7$ ), 6,73 (s, 1H,  $H_4$ ), 4,20 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,07 (t, 2H,  $H_2$ ), 2,21 (t,  $J=7,4$  Hz, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,44 (m, 2H,  $H_{3'}$ ), 1,22 (m, 16H,  $H_{4'}$ - $H_{11'}$ ), 0,84 (t,  $J=6,9$  Hz, 3H,  $H_{12'}$ );  **$^{13}C$ -RMN** (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 172,6 ( $C_{1'}$ ), 151,2 ( $C_5$ ), 144,1 ( $C_6$ ), 139,7 ( $C_8$ ), 126,2 ( $C_3$ ), 118,4 ( $C_4$ ), 112,2 ( $C_7$ ), 63,2 ( $C_1$ ), 33,4 ( $C_{2'}$ ), 31,8 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{10'}$ ), 28,9-28,3 ( $C_{4'}$ - $C_{9'}$ ), 24,3 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{11'}$ ), 13,9 ( $C_{12'}$ ); **MS-HR** (FAB)  $m/z$  calculado para  $C_{20}H_{31}NO_6Na$   $[M+Na]^+$  404,2049. Encontrado: 404,2045 (1,0 ppm).

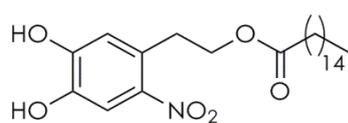
#### 5.1.1.7. Miristato de nitrohidroxitirosilo (**56**)



Se preparó a partir de **49** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla de dietil éter/hexano 2:1. Se obtuvo el producto puro como un sólido blanco (60%). **P.f.:** 84-85°C;  **$^1H$ -RMN** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 10,11 (bs, 2H, 2 OH fenólicos), 7,46 (s, 1H,  $H_7$ ), 6,73 (s, 1H,  $H_4$ ), 4,20 (t,  $J=6,6$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,07 (t, 2H,  $H_2$ ), 2,20 (t,  $J=7,4$  Hz, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,44 (m, 2H,  $H_{3'}$ ), 1,22 (m, 20H,  $H_{4'}$ - $H_{13'}$ ), 0,84 (t,  $J=6,9$  Hz, 3H,  $H_{14'}$ );  **$^{13}C$ -RMN** (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 172,7 ( $C_{1'}$ ), 151,2 ( $C_5$ ), 144,1 ( $C_6$ ), 139,7 ( $C_8$ ), 126,2 ( $C_3$ ), 118,4 ( $C_4$ ), 112,2 ( $C_7$ ), 63,2 ( $C_1$ ), 33,4 ( $C_{2'}$ ), 31,8 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{12'}$ ), 29,0-28,3 ( $C_{4'}$ - $C_{11'}$ ), 24,3 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{13'}$ ), 13,9 ( $C_{14'}$ ); **MS-HR** (FAB)  $m/z$  calculado para  $C_{22}H_{35}NO_6Na$   $[M+Na]^+$  432,2362. Encontrado: 432,2361 (0,2 ppm).

## 5. Resultados

### 5.1.1.8. Palmitato de nitrohidroxitirosilo (**57**)

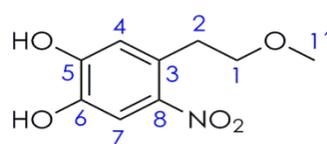


El éster correspondiente se preparó a partir de **49** siguiendo el procedimiento general y usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla de dietil éter/hexano 2:1. Se obtuvo el producto puro como un sólido blanco (55%). **P.f.:** 90-91°C; **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 10,12 (bs, 2H, 2 OH fenólicos), 7,47 (s, 1H, *H*<sub>7</sub>), 6,73 (s, 1H, *H*<sub>4</sub>), 4,20 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, *H*<sub>1</sub>), 3,07 (t, 2H, *H*<sub>2</sub>), 2,20 (t, *J*=7,4 Hz, 2H, *H*<sub>2'</sub>), 1,44 (m, 2H, *H*<sub>3'</sub>), 1,22 (m, 24H, *H*<sub>4</sub>-*H*<sub>15'</sub>), 0,84 (t, *J*=6,9 Hz, 3H, *H*<sub>16'</sub>); **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 172,6 (*C*<sub>1'</sub>), 151,2 (*C*<sub>5</sub>), 144,1 (*C*<sub>6</sub>), 139,7 (*C*<sub>8</sub>), 126,2 (*C*<sub>3</sub>), 118,4 (*C*<sub>4</sub>), 112,2 (*C*<sub>7</sub>), 63,2 (*C*<sub>1</sub>), 33,4 (*C*<sub>2'</sub>), 31,8 (*C*<sub>2</sub>), 31,2 (*C*<sub>14'</sub>), 29,0-28,3 (*C*<sub>4</sub>-*C*<sub>13'</sub>), 24,3 (*C*<sub>3'</sub>), 22,0 (*C*<sub>15'</sub>), 13,9 (*C*<sub>16'</sub>); **MS-HR** (FAB) *m/z* calculado para C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>6</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 460,2675. Encontrado: 460,2689 (3,0 ppm).

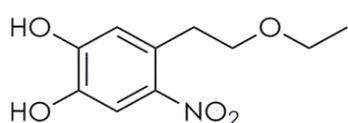
### 5.1.2. Preparación y caracterización de éteres de nitrohidroxitirosilo

Seguendo el procedimiento descrito en los apartados 4.1.4. y 4.1.5. se han preparado los siguientes compuestos:

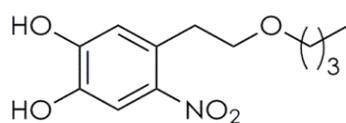
#### 5.1.2.1. 4-(2-Metoxietil)-5-nitrobenzeno-1,2-diol (**58**)



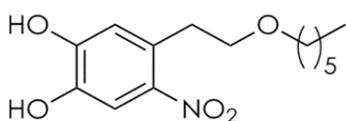
Se preparó a partir de **36** siguiendo el procedimiento general de nitración usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla de acetato de etilo/hexano 2:1. El producto puro fue obtenido como un sólido blanco (68%). **P.f.:** 152-154°C; **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 10,06 (bs, 2H, 2 OH fenólicos), 7,45 (s, 1H, *H*<sub>7</sub>), 6,75 (s, 1H, *H*<sub>4</sub>), 3,48 (t, *J*=6,6 Hz, 2H, *H*<sub>1</sub>), 3,21 (s, 3H, *H*<sub>1'</sub>), 2,99 (t, 2H, *H*<sub>2</sub>); **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 151,0 (*C*<sub>5</sub>), 143,9 (*C*<sub>6</sub>), 139,6 (*C*<sub>8</sub>), 127,3 (*C*<sub>3</sub>), 118,3 (*C*<sub>4</sub>), 112,0 (*C*<sub>7</sub>), 71,7 (*C*<sub>1</sub>), 57,8 (*C*<sub>1'</sub>), 32,5 (*C*<sub>2</sub>); **MS-HR** (CI) *m/z* calculado para C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub> [M]<sup>+</sup> 213,0637. Encontrado: 213,0632 (2,5 ppm).

5.1.2.2. 4-(2-Etoxietil)-5-nitrobenceno-1,2-diol (**59**)

Se preparó a partir de **37** según el procedimiento general de nitración, usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla de acetato de etilo/hexano 2:1. Se obtuvo el producto puro como un sólido blanco (73%). **P.f.:** 94-96°C; **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 10,11 (bs, 2H, 2 OH fenólicos), 7,44 (s, 1H, *H*<sub>7</sub>), 6,76 (s, 1H, *H*<sub>4</sub>), 3,51 (t, *J*=6,7 Hz, 2H, *H*<sub>1</sub>), 3,39 (c, *J*=7,0 Hz, 2H, *H*<sub>1'</sub>), 2,99 (t, 2H, *H*<sub>2</sub>), 1,06 (t, 3H, *H*<sub>2'</sub>); **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 151,0 (*C*<sub>5</sub>), 143,9 (*C*<sub>6</sub>), 139,8 (*C*<sub>8</sub>), 127,3 (*C*<sub>3</sub>), 118,3 (*C*<sub>4</sub>), 112,0 (*C*<sub>7</sub>), 69,6 (*C*<sub>1</sub>), 65,2 (*C*<sub>1'</sub>), 32,8 (*C*<sub>2</sub>), 15,0 (*C*<sub>2'</sub>); **MS-HR** (CI) *m/z* calculado para C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 228,0872. Encontrado: 228,0867 (2,2 ppm).

5.1.2.3. 4-(2-Butoxietil)-5-nitrobenceno-1,2-diol (**60**)

Se preparó a partir de **38** siguiendo el procedimiento general de nitración usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla de cloroformo/metanol 40:1. El producto puro fue obtenido como un sirupo (63%). **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 10,2 (bs, 2H, 2 OH fenólicos), 7,44 (s, 1H, *H*<sub>7</sub>), 6,75 (s, 1H, *H*<sub>4</sub>), 3,51 (t, *J*=6,7 Hz, 2H, *H*<sub>1</sub>), 3,33 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, *H*<sub>1'</sub>), 2,99 (t, 2H, *H*<sub>2</sub>), 1,42 (q, 2H, *H*<sub>2'</sub>), 1,26 (m, 2H, *H*<sub>3'</sub>), 0,84 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, *H*<sub>4'</sub>); **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 151,0 (*C*<sub>5</sub>), 143,8 (*C*<sub>6</sub>), 139,8 (*C*<sub>8</sub>), 127,4 (*C*<sub>3</sub>), 118,4 (*C*<sub>4</sub>), 112,0 (*C*<sub>7</sub>), 69,8 (*C*<sub>1</sub>), 69,6 (*C*<sub>1'</sub>), 32,8 (*C*<sub>2</sub>), 31,2 (*C*<sub>2'</sub>), 18,8 (*C*<sub>3'</sub>), 13,7 (*C*<sub>4'</sub>); **MS-HR** (CI) *m/z* calculado para C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 256,1185. Encontrado: 256,1183 (0,8 ppm).

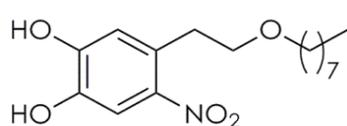
5.1.2.4. 4-(2-Hexiloxietil)-5-nitrobenceno-1,2-diol (**61**)

Se preparó a partir de **39** según el procedimiento general, aunque en este caso se hizo necesaria la adición de un 10% de metanol como cosolvente, y usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla de cloroformo/metanol 40:1. Se obtuvo el producto puro como un sirupo (74%). **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 10,02 (bs, 2H, 2 OH fenólicos), 7,44 (s, 1H, *H*<sub>7</sub>), 6,75 (s, 1H, *H*<sub>4</sub>), 3,50 (t, *J*=6,7 Hz, 2H, *H*<sub>1</sub>), 3,32 (t, *J*=6,6 Hz, 2H, *H*<sub>1'</sub>), 2,99 (t, 2H, *H*<sub>2</sub>), 1,43 (q, 2H, *H*<sub>2'</sub>), 1,26-1,20 (m, 6 H, *H*<sub>3'-H</sub><sub>5'</sub>), 0,83 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, *H*<sub>6'</sub>); **<sup>13</sup>C-RMN**

## 5. Resultados

(125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 151,0 ( $C_5$ ), 143,8 ( $C_6$ ), 139,8 ( $C_8$ ), 127,4 ( $C_3$ ), 118,4 ( $C_4$ ), 112,0 ( $C_7$ ), 69,9 ( $C_1$ ), 69,8 ( $C_{1'}$ ), 32,7 ( $C_2$ ), 31,0 ( $C_{4'}$ ), 29,1 ( $C_{2'}$ ), 25,2 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{5'}$ ), 13,8 ( $C_{6'}$ ); **MS-HR** (CI)  $m/z$  calculado para  $C_{14}H_{22}NO_5$   $[M+H]^+$  284,1498. Encontrado: 284,1494 (1,4 ppm).

### 5.1.2.5. 4-Nitro-5-(2-octiloxietil)benceno-1,2-diol (**62**)



Se preparó a partir de **40** de forma similar al compuesto anterior, usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla de acetato de etilo/hexano 1:1. Se obtuvo el producto puro como un sólido blanco (66%). **P.f.:** 84-86°C;  **$^1H$ -RMN** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 10,02 (bs, 2H, 2 OH fenólicos), 7,44 (s, 1H,  $H_7$ ), 6,75 (s, 1H,  $H_4$ ), 3,50 (t,  $J=6,7$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,32 (t,  $J=6,6$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,99 (t, 2H,  $H_2$ ); 1,43 (q, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,26-1,20 (m, 10 H,  $H_3$ - $H_7$ ), 0,84 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H,  $H_{8'}$ );  **$^{13}C$ -RMN** (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 151,0 ( $C_5$ ), 143,8 ( $C_6$ ), 139,7 ( $C_8$ ), 127,4 ( $C_3$ ), 118,3 ( $C_4$ ), 112,0 ( $C_7$ ), 69,9 ( $C_1$ ), 69,8 ( $C_{1'}$ ), 32,7 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{6'}$ ), 29,1 ( $C_{2'}$ ), 28,7 ( $C_{4'}$ ), 28,6 ( $C_{5'}$ ), 25,6 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{7'}$ ), 13,9 ( $C_{8'}$ ); **MS-HR** (CI)  $m/z$  calculado para  $C_{16}H_{26}NO_5$   $[M+H]^+$  312,1811. Encontrado: 312,1808 (1,0 ppm).

## 5.2. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los nitroderivados lipofílicos de HTy

Con el fin de caracterizar la capacidad antioxidante de los nuevos derivados sintéticos de nitrohidroxitirosol (NO<sub>2</sub>HTy, **49**), ésteres (**50–57**) y éteres (**59–62**), se determinó la capacidad reductora de radicales libres mediante el ensayo FRAP y la actividad de secuestro de radicales libres mediante dos ensayos complementarios, ABTS y ORAC. Asimismo, se empleó como compuesto de referencia el hidroxitirosol (HTy, **2**) por sus reconocidas propiedades antioxidantes.

### 5.2.1. Caracterización antioxidante de los derivados acílicos de nitrohidroxitirosol

#### 5.2.1.1. Ensayo FRAP

El NO<sub>2</sub>HTy (**49**) mostró una elevada actividad reductora y significativamente superior a la de su precursor natural, HTy (**2**). La capacidad antioxidante de los nuevos ésteres de nitrohidroxitirosilo (**50–57**) varió dependiendo de la longitud de la cadena lateral hidrocarbonada (Tabla 5.1). Así, mientras acetato (**50**) y butanoato de nitrohidroxitirosilo (**51**) presentaron una actividad antioxidante superior y similar a NO<sub>2</sub>HTy (**49**), respectivamente, el resto de compuestos de la serie (**52–57**) fueron menos activos que su precursor (**49**). En particular, los compuestos decanoato (**54**), laurato (**55**), miristato (**56**) y palmitato de nitrohidroxitirosilo (**57**) vieron disminuida significativamente su potencia antioxidante alcanzando valores inferiores incluso al propio HTy (**2**).

#### 5.2.1.2. Ensayo ABTS

El estudio de la capacidad de secuestro de radicales libres para NO<sub>2</sub>HTy (**49**) y sus acil derivados (**50–57**) ofreció una tendencia similar a la mostrada para el estudio de la capacidad reductora (ensayo FRAP). Dentro de los nitroderivados, el compuesto más destacable fue acetato de nitrohidroxitirosilo (**50**) que mostró una capacidad de secuestro de radicales libres superior a NO<sub>2</sub>HTy (**49**) seguido por el derivado acil butanoato (**51**), con actividad semejante al precursor (**49**). El resto de nitroderivados ensayados (**52–57**)

## 5. Resultados

mostraron menor actividad antioxidante que NO<sub>2</sub>HTy, aunque mayor que HTy (**2**). Estos resultados ponen de manifiesto la positiva influencia que el grupo funcional nitro induce en la capacidad antioxidante de NO<sub>2</sub>HTy (**49**) y sus acil derivados (**50–57**), mejorando significativamente la actividad en comparación con el propio precursor natural, HTy (**2**) (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1**

Determinación del poder reductor (FRAP) y capacidad de secuestro de radicales libres (ABTS y ORAC) de hidroxitirosol (**2**), nitrohidroxitirosol (**49**) y los ésteres de nitrohidroxitirosilo (**50–57**). Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar de tres determinaciones para los ensayos FRAP y ABTS y cuatro determinaciones para el ensayo ORAC. Los resultados se expresan como capacidad antioxidante equivalente al compuesto Trolox (TEAC, mM). Diferente letra dentro de la columna indica que los valores son diferentes estadísticamente ( $p < 0,05$ )

Compuesto	Ensayo FRAP (mM)	Ensayo ABTS (mM)	Ensayo ORAC (mM)
<b>2*</b>	1,39 $\pm$ 0,05 <sup>e</sup>	0,84 $\pm$ 0,02 <sup>g</sup>	1,92 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>
<b>49</b>	2,51 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	2,13 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	2,48 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
<b>50</b>	3,02 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	2,42 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	2,61 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
<b>51</b>	2,58 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	2,12 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	2,51 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
<b>52</b>	2,21 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	1,86 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	2,22 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>
<b>53</b>	1,67 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>	1,74 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>	2,14 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>
<b>54</b>	0,68 $\pm$ 0,06 <sup>f</sup>	1,68 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>	1,94 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>
<b>55</b>	0,48 $\pm$ 0,05 <sup>g</sup>	1,50 $\pm$ 0,05 <sup>e</sup>	1,88 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>
<b>56</b>	0,35 $\pm$ 0,02 <sup>h</sup>	1,35 $\pm$ 0,04 <sup>f</sup>	1,63 $\pm$ 0,04 <sup>e</sup>
<b>57</b>	0,21 $\pm$ 0,03 <sup>i</sup>	1,36 $\pm$ 0,06 <sup>f</sup>	1,56 $\pm$ 0,05 <sup>e</sup>

\* Los valores de FRAP y ABTS de HTy (**2**) han sido publicados previamente por Mateos y cols (2008) y se incluyen con fines comparativos

### 5.2.1.3. Ensayo ORAC

Los resultados de la determinación de la capacidad de secuestro de radicales libres a través del ensayo ORAC para la serie acílica de compuestos nitroderivados (**50–57**) y sus precursores, NO<sub>2</sub>HTy (**49**) y HTy (**2**), están de acuerdo con los resultados presentados de los análisis FRAP y ABTS (Tabla 5.1). NO<sub>2</sub>HTy (**49**) mostró una potencia antioxidante superior a HTy (**2**) mientras que sus derivados acílicos mostraron diferente comportamiento en relación a la longitud de la cadena hidrocarbonada. Por ejemplo, la cadena corta del acetato (**50**) y butirato de nitrohidroxitirosilo (**51**) se asoció a una actividad superior o similar a NO<sub>2</sub>HTy (**49**), respectivamente, mientras que una longitud de

cadena superior (**52–57**) indujo una disminución significativa de la capacidad antioxidante. En general, casi todos los nitroderivados mostraron una capacidad antioxidante mayor (**49–53**) o de igual (**54–55**) potencia que HTy (**2**), excepto los derivados miristato (**56**) y palmitato de nitrohidroxitirosilo (**57**).

### 5.2.2. Caracterización antioxidante de los derivados alquílicos de nitrohidroxitirosilo

#### 5.2.2.1. Ensayo FRAP

El análisis de la capacidad reductora de los nuevos éteres de nitrohidroxitirosilo (**59–62**) también confirió resultados que muestran variaciones en función de la longitud de la cadena lateral hidrocarbonada (Tabla 5.2). Así, los derivados de menor cadena, etil éter (**59**) y butil éter (**60**) de nitrohidroxitirosilo, presentaron una actividad antioxidante de mayor e igual potencia que su precursor, NO<sub>2</sub>HTy (**49**), respectivamente. Sin embargo, un aumento de la longitud de la cadena produjo una disminución significativa de la actividad antioxidante para los compuestos hexil éter (**61**) y octil éter (**62**), alcanzando valores inferiores al propio HTy para el caso del nitroderivado de mayor longitud de cadena (**62**).

#### 5.2.2.2. Ensayo ABTS

El estudio de la capacidad de secuestro de radicales libres de los derivados alquílicos de nitrohidroxitirosilo (**59–62**) ofreció un patrón bastante similar al obtenido para el ensayo FRAP. Los nitroderivados alquílicos más destacables por su acción antioxidante fueron los de menor longitud de cadena (etil éter y butil éter, **59–60**). El resto de nitroderivados ensayados (**61–62**) mostraron menor actividad antioxidante que NO<sub>2</sub>HTy (**49**), aunque siempre superior a la del propio precursor natural HTy (**2**) (Tabla 5.2).

#### 5.2.2.3. Ensayo ORAC

Los resultados de la determinación de la capacidad de secuestro de radicales libres a través del ensayo ORAC para la serie alquílica de compuestos nitroderivados (**59–62**) y sus precursores, NO<sub>2</sub>HTy (**49**) y HTy (**2**), coincidieron en parte con los resultados de los análisis FRAP y ABTS (Tabla 5.2). Así, el compuesto más antioxidante en comparación con el NO<sub>2</sub>HTy (**49**) fue el

etil éter (**59**), mostrando a continuación una tendencia bajista de la actividad a medida que aumentaba la longitud de la cadena. Coincidiendo con los resultados del análisis ABTS, todos los compuestos ensayados fueron más antioxidantes que el precursor natural, HTy (**2**).

**Tabla 5.2**

Determinación del poder reductor (FRAP) y capacidad de secuestro de radicales libres (ABTS y ORAC) de hidroxitirosol (**2**), nitrohidroxitirosol (**49**) y los éteres de nitrohidroxitirosilo (**59-62**). Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar de tres determinaciones para los ensayos FRAP y ABTS y cuatro determinaciones para el ensayo ORAC. Los resultados se expresan como capacidad antioxidante equivalente al compuesto Trolox (TEAC, mM). Diferente letra dentro de la columna indica que los valores son diferentes estadísticamente ( $p < 0,05$ )

Compuesto	Ensayo FRAP (mM)	Ensayo ABTS (mM)	Ensayo ORAC (mM)
<b>2*</b>	1,39 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	0,84 $\pm$ 0,02 <sup>e</sup>	1,92 $\pm$ 0,04 <sup>f</sup>
<b>49</b>	2,51 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	2,13 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	2,48 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
<b>59</b>	2,68 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	2,13 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	2,60 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
<b>60</b>	2,52 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	2,00 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	2,36 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>
<b>61</b>	1,37 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	1,44 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	2,14 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>
<b>62</b>	1,01 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>	1,26 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>	2,01 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>

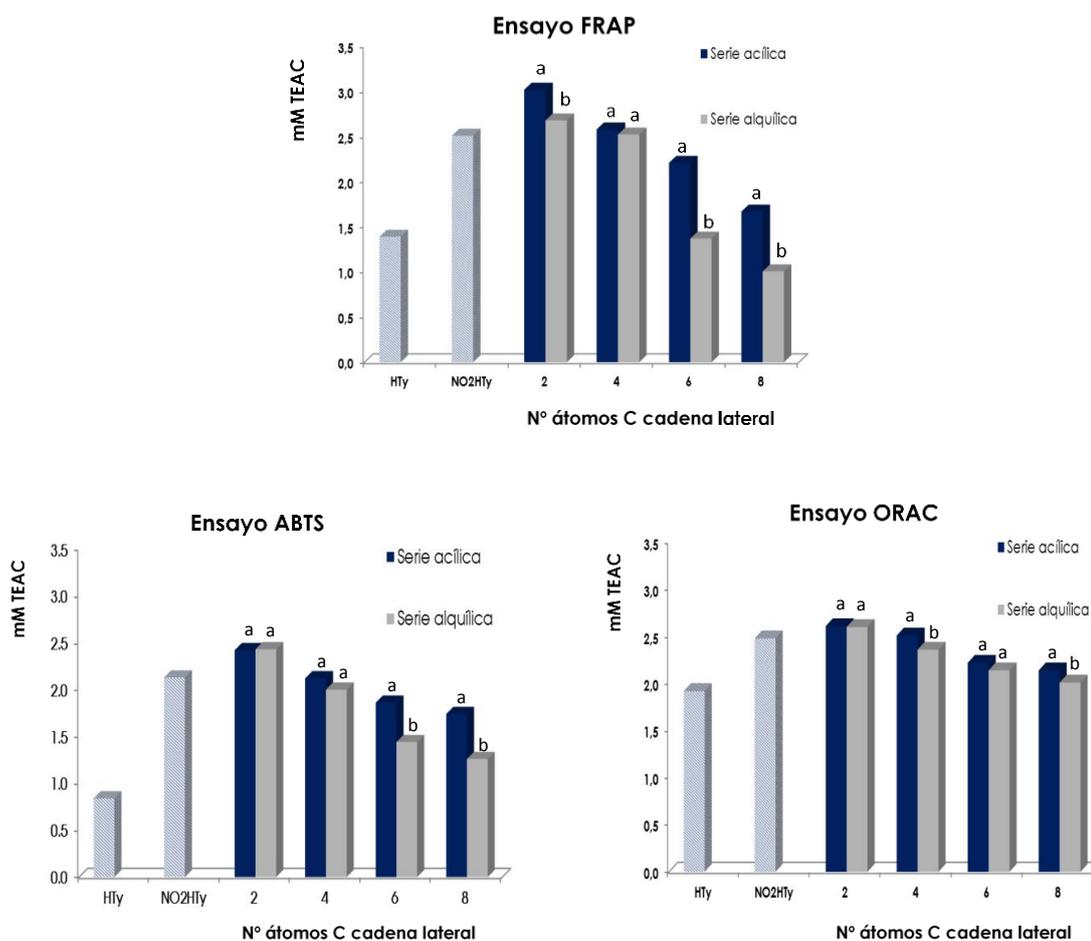
\* Los valores de FRAP y ABTS de HTy (**2**) han sido publicados previamente por Mateos y cols (2008) y se incluyen con fines comparativos

### 5.2.3. Comparación de la actividad antioxidante de las dos series de compuestos derivados del nitrohidroxitirosol

El análisis global de la caracterización de la actividad antioxidantes de los derivados acíclicos (**50-57**) y alquílicos (**59-62**) mediante los ensayos FRAP, ABTS y ORAC, mostró la misma relación parabólica entre el poder antioxidante y la longitud de la cadena hidrocarbonada lateral, alcanzando un máximo al mismo número de átomos de carbono, acetato (**50**) y éter etílico (**59**), seguido de un descenso progresivo de la actividad a medida que aumentaba el tamaño de la cadena lateral (Figura 5.1).

Si se compara la actividad antioxidante de compuestos con el mismo tamaño de cadena lateral pero distinta naturaleza química (serie acíclica (**50-57**) vs serie alquílica (**59-62**)) se observa una ligera menor actividad de la serie

alquílica que la acíclica y dicha diferencia se acentúa para los compuestos más lipofílicos (**61** y **62**) (Ver Figura 5.1, Ensayo FRAP y ABTS).



**Figura 5.1**

Análisis comparativo de la capacidad antioxidante determinada mediante los ensayos FRAP, ABTS y ORAC de las dos series de compuestos derivados de NO<sub>2</sub>HTy con igual longitud de la cadena lateral, en comparación con HTy y NO<sub>2</sub>HTy. Los números en el eje de abscisas representan el número de átomos de carbono de la cadena lateral. Diferente letra (a ó b) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) al comparar compuestos homólogos de la dos series.

En general, los nitroderivados mostraron mejor capacidad de captación de radicales libres que actividad reductora, en particular para los compuestos más lipofílicos (Tablas 5.1 y 5.2). Estos resultados podrían estar señalando a la actividad de secuestro de radicales libres como el mecanismo preferente de actuación para los nitroderivados de HTy.

### 5.3. Estudio de la biodisponibilidad y metabolismo de los nitroderivados de HTy *in vitro*

Con el fin de ahondar en el conocimiento de la función biológica de los nitroderivados de HTy seleccionados (nitrohidroxitirosol (NO<sub>2</sub>HTy, **49**), acetato de nitrohidroxitirosilo (NO<sub>2</sub>HTy-A, **50**) y éter etílico de nitrohidroxitirosilo (NO<sub>2</sub>HTy-E, **59**), en base a los resultados obtenidos tras la caracterización de su capacidad antioxidante *in vitro*, es importante conocer la biodisponibilidad y metabolismo en nuestro organismo. Así, se ofrecen los resultados del estudio del transporte y metabolismo en un sistema modelo del epitelio intestinal, mediante el uso de monocapas de células Caco-2. Además, se incluyen resultados procedentes del metabolismo hepático de estos compuestos en un sistema modelo celular del hígado, mediante el empleo de cultivos celulares de hepatoma humano HepG2.

#### 5.3.1. Transporte y metabolismo de los compuestos fenólicos *in vitro* en células Caco-2

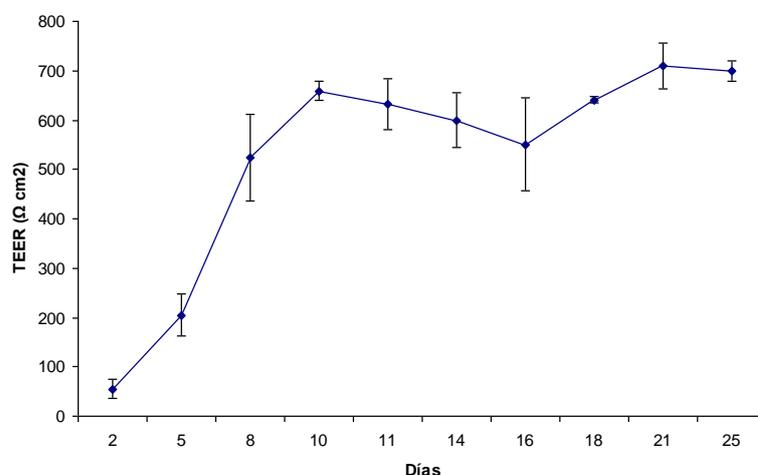
##### 5.3.1.1. Optimización del modelo celular de epitelio intestinal humano con células Caco-2

En primer lugar se hizo necesario poner a punto el modelo de diferenciación celular de las células de colon humano Caco-2 en el sistema de Transwell o bicameral. Se ensayaron distintas condiciones de siembra y mantenimiento previamente descritas en la bibliografía, utilizando dos determinaciones, la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y la prueba del Rojo Fenol, para valorar la estabilidad e integridad de la monocapa celular Caco-2 además de su monitorización por microscopio óptico.

Tomando como referencia el protocolo de Hubatsch y cols. (2007), en el que se describe cómo realizar los ensayos de permeabilidad de fármacos a través de la monocapa de Caco-2, y a partir de un lote de células de pase 48 proporcionado por el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, se obtuvieron células diferenciadas estables. Las condiciones finalmente utilizadas implicó una siembra de 400.000 células por pocillo de 4,67 cm<sup>2</sup> (Transwell de 6 pocillos y 0,4 μm de tamaño de poro) mantenidas en medio DMEM rico en glucosa, HEPES, sin rojo fenol, suplementado con 10% de

FBS inactivado con calor para desnaturalizar las proteínas (45 min a 56°C) además de un 1% de aminoácidos no esenciales, 10.000 U/mL de penicilina y 1000 µg/mL de estreptomicina. Los Transwells utilizados, de mayor área que los del protocolo original (1,1cm<sup>2</sup>), permitían una monitorización más cómoda del desarrollo de la monocapa de células mediante el microscopio óptico, además de presentar mayor volumen apical y basolateral para toma de muestra y análisis complementarios de identificación de metabolitos.

En la Figura 5.2 se representan los valores de TEER, que determina la resistencia de la monocapa de células Caco-2 al paso de la corriente eléctrica, durante los días postsiembra en las condiciones previamente descritas. Se observaron valores óptimos de resistencia en torno al décimo día postsiembra, que se mantuvieron hasta al menos los 25 días de registro. Aquellos pocillos que mostraban valores anormalmente más pequeños indicaban anomalías en la formación de la monocapa, no utilizándose para los ensayos. De manera general, los experimentos de transporte y metabolismo se llevaron a cabo a los 20-21 días postsiembra.

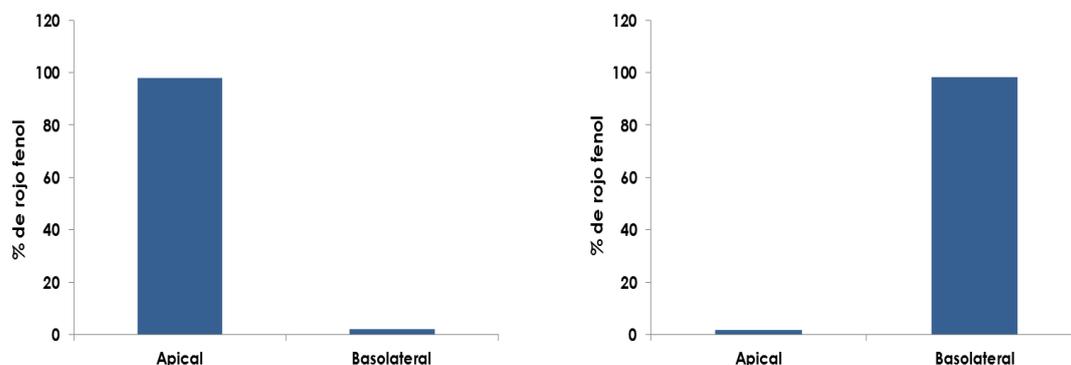


**Figura 5.2**  
Evolución de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de las células Caco-2 a lo largo del tiempo tras la siembra en el sistema de Transwell

Una vez evaluada la resistencia de la monocapa, y el mismo día de la puesta de condiciones con los compuestos fenólicos para llevar a cabo los estudios de biodisponibilidad, se reservaron dos pocillos para comprobar el estado de la monocapa mediante la prueba del Rojo Fenol. Este ensayo cuantifica el paso del colorante fenolsulfonftaleína (PSP) a través de la

## 5. Resultados

monocapa de células Caco-2, dónde la transferencia del colorante PSP es inversamente proporcional a la integridad de la monocapa. Así, se valoró la transferencia del colorante PSP en ambos sentidos, de modo que valores inferiores a 0,1 % de PSP en el lado contrario al de carga indicaban un estado óptimo de la monocapa de las células Caco-2 (Figura 5.3).



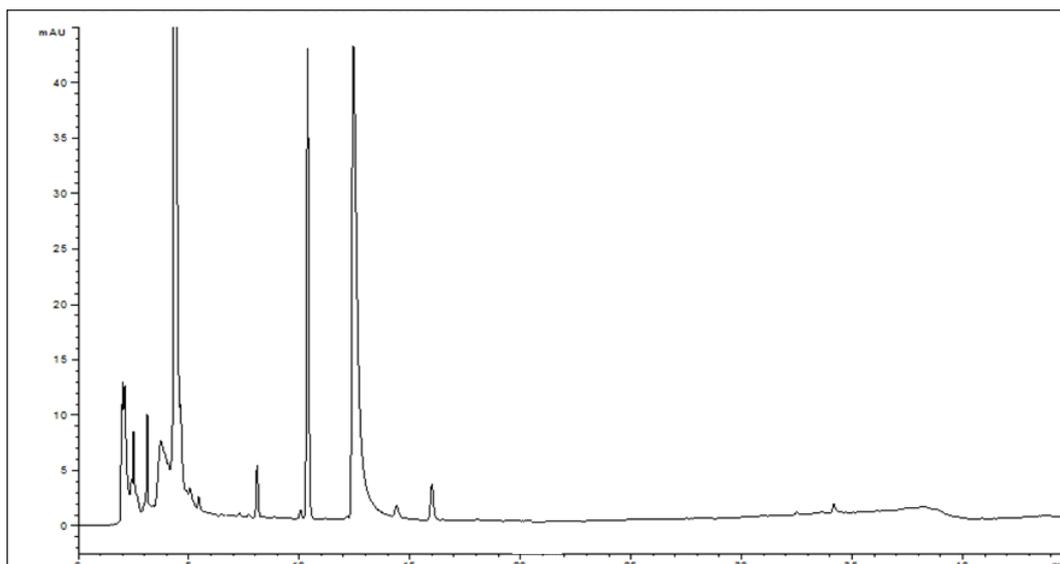
**Figura 5.3**

Porcentaje del colorante rojo fenol (fenolsulfonftaleína, PSP) en los compartimentos del Transwell tras su carga en el lado apical (izquierda) y basolateral (derecha) correspondiente a monocapas de células Caco-2 perfectamente diferenciadas

### 5.3.1.2. Identificación y caracterización del metabolismo de los nitroderivados de HTy por células Caco-2

Una vez evaluada la estabilidad de la monocapa de células Caco-2 se procedió al estudio del metabolismo de los nitrocatecoles.

En la Figura 5.4 se representa el cromatograma correspondiente al análisis del medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de las células Caco-2 por HPLC-DAD, para conocer sus componentes y evitar interferencias con los nitroderivados de HTy y sus metabolitos. A partir de los 5 minutos se detectaron dos picos dominantes a tiempo de retención (TR) 10,4 y 12,4 min junto con otros tres picos a TR de 8,1, 14,4 y 16,0 min de menor intensidad, propios del medio de cultivo, y cuya caracterización nos permitió diferenciar aquellos resultantes del metabolismo propio de los nitrocatecoles.



**Figura 5.4**  
Perfil cromatográfico a  $\lambda_{\max}$  de 280 nm del medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de las células Caco-2

Los experimentos se realizaron con 100  $\mu\text{M}$  de cada compuesto fenólico. Esta dosis es suprafisiológica, pues hasta 50  $\mu\text{M}$  se consideran valores realistas de fenoles presentes en el lumen del tracto gastrointestinal (Covas y cols., 2006a). Sin embargo se aumentó con objeto de facilitar la identificación de posibles metabolitos tanto extra como intracelularmente.

A continuación, se adicionaron los nitroderivados de HTy apicalmente en experimentos independientes, disueltos en una solución acuosa con un pequeño porcentaje de DMSO para favorecer su disolución en agua al preparar la disolución madre, y ácido ascórbico para protegerlo de la oxidación, quedando una concentración final en el pocillo de 100  $\mu\text{M}$  del fenol, 0,1% de DMSO y 300  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico. Los fenoles se incubaron con las células Caco-2 durante 1, 2 y 4 h para evaluar una posible relación tiempo dependiente con el rendimiento de la metabolización. Mientras que 1 y 2 h emulan el tiempo de permanencia en el tracto gastrointestinal, el tiempo de 4 h se seleccionó para favorecer la formación de metabolitos y obtener una mejor caracterización metabólica de estos compuestos. Todos los medios presentes en ambos lados de la monocapa de células, apical y basolateral, además del contenido citoplasmático, se caracterizaron por HPLC-DAD a la  $\lambda_{\max}$  de 280 nm. En general, además de los picos propios del medio de cultivo

## 5. Resultados

se detectaron nuevos picos cromatográficos que sugirieron la formación de metabolitos a expensas de los respectivos precursores.

Seguidamente, con objeto de conocer la identidad molecular de los potenciales metabolitos se llevaron a cabo diferentes procedimientos:

a) Comparación de TR y características espectrométricas con los compuestos estándares sintéticos. Así, los compuestos parentales fueron identificados por comparación con los espectros y TR de los patrones puros. Los picos cromatográficos de los posibles metabolitos se asignaron en base al espectro UV-vis, similar al del compuesto original, si bien su TR se vio modificado por las distintas conjugaciones producidas durante el metabolismo celular.

b) Análisis y confirmación de las estructuras por espectrometría de masas acoplado a HPLC (LC-MS) en modo negativo. Esta técnica permite determinar la estructura de los metabolitos, glucuronidados, metilados o sulfatados y combinación entre ellos, pero no la posición de los grupos sustituyentes.

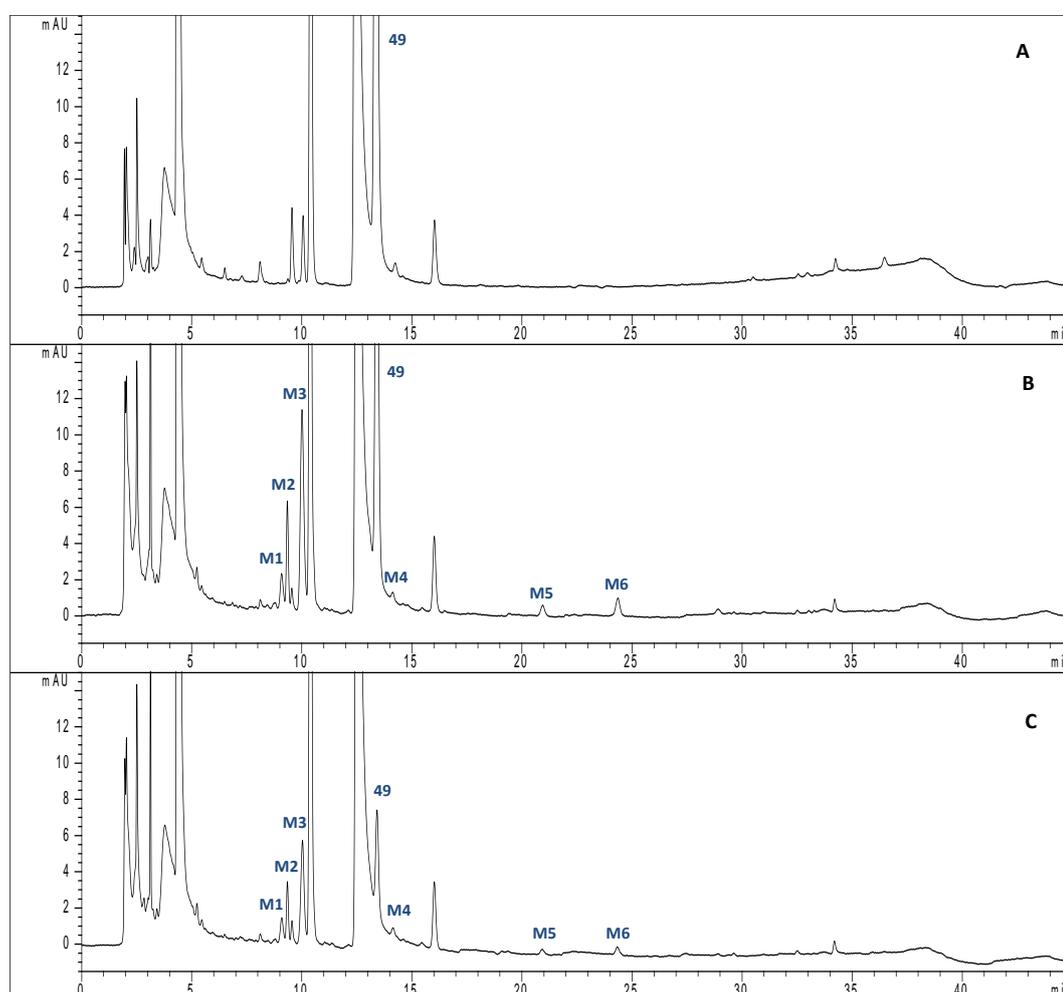
c) Hidrólisis con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa de los metabolitos conjugados. El medio de cultivo que estuvo en contacto con las células Caco-2 y que contiene los metabolitos derivados de los nitrocatecoles se trató con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa para determinar la presencia de derivados glucuronidados y/o sulfatados. De este modo, aquellos picos cromatográficos correspondientes a metabolitos de esta naturaleza, desaparecieron tras la hidrólisis con el consiguiente aumento del precursor.

d) Conjugación *in vitro* de los estándares puros y comparación con los obtenidos por biotransformación. Los derivados metilados y glucuronidados de nitrocatecoles se confirmaron tras el análisis cromatográfico de los compuestos obtenidos sintéticamente como se ha descrito en el apartado 4.3.3.2.

### 5.3.1.2.1. Identificación de los metabolitos derivados de nitrohidroxitirosol (**49**)

Previo a la incubación del patrón NO<sub>2</sub>HTy (**49**) con las células, se evaluó cromatográficamente disuelto en el medio de cultivo a la concentración de estudio, 100  $\mu$ M. En la Figura 5.5 se muestra el cromatograma obtenido a 280 nm, observando un intenso pico a TR de 13,4 min correspondiente al

compuesto **49** (Figura 5.5, panel A) y que no coelúa con el resto de los picos inherentes al medio ya descritos en la Figura 5.4.



**Figura 5.5**

Perfiles cromatográficos a  $\lambda_{\max}$  de 280 nm del compuesto nitrohidroxitirosol ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ , **49**) a concentración de 100  $\mu\text{M}$  disuelto en medio de cultivo (Panel A) y tras su incubación con células Caco-2 durante 4 horas en el compartimento apical (Panel B) y basolateral (Panel C)

A continuación se llevó a cabo el estudio del metabolismo del nitrocatecol  $\text{NO}_2\text{HTy}$  con las células Caco-2. En la figura 5.5 se representan los cromatogramas correspondientes al medio de cultivo de los compartimentos apical (Panel B) y basolateral (Panel C) tras la incubación de  $\text{NO}_2\text{HTy}$  (**49**) con las células. Se detectaron seis picos (M1–M6) aparte del compuesto parental  $\text{NO}_2\text{HTy}$  (**49**) y los picos propios del medio. Todos mostraron un espectro UV-vis similar a  $\text{NO}_2\text{HTy}$ , con desplazamientos bato- o hipsocrómicos de uno o dos máximos de absorción comprendidos entre 282 a 354 nm, indicando pertenecer al mismo grupo de compuestos (Ver anexo 9.5).

## 5. Resultados

Seguidamente se procedió al análisis y caracterización de los metabolitos presentes en ambos compartimentos mediante los procedimientos citados anteriormente (apartado 5.3.1.2.). Los picos etiquetados como M1, M2 y M3 aparecían a TR más pequeños que el NO<sub>2</sub>HTy (**49**) indicando una mayor naturaleza hidrofílica que el precursor. Además, desaparecieron tras practicar la hidrólisis enzimática con  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa, con el subsiguiente incremento del área del pico correspondiente al compuesto parental. El pico M4, aunque de carácter más lipofílico que el NO<sub>2</sub>HTy, también desapareció tras la hidrólisis enzimática. En paralelo, el análisis cromatográfico de la solución resultante tras llevar a cabo la reacción *in vitro* de glucuronidación de NO<sub>2</sub>HTy con la enzima UDP-glucuronil transferasa presente en la fracción microsomal de hígado de rata y ácido glucurónico, proporcionó dos picos cromatográficos a los mismos TR que M1 y M2: 9,1 y 9,3 min, respectivamente, e idénticas características espectrofotométricas UV-vis. Por último, el análisis mediante la técnica LC-MS mostró un ion cuasimolecular [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 374 para M1 y M2 junto con un pico a *m/z* 198 correspondiente a un ion formado por la pérdida del grupo glucurónido. Mientras que los picos cromatográficos M3 y M4 proporcionaron un ion [M-H]<sup>-</sup> a 388 además de los iones-fragmento a *m/z* 374, 212 y 198 formados tras la pérdida de 14, 176 y 176+14 unidades de masa, propio de un radical metilo, un grupo glucurónido y la suma de ambos, respectivamente. Todos estos resultados permitieron confirmar la identidad de M1–M2 como derivados monoglucuronidados de NO<sub>2</sub>HTy y M3–M4 como derivados metilglucuronidados de NO<sub>2</sub>HTy (**49**).

Por otra parte, los TR mayores de los metabolitos M5 y M6 (21,0 y 24,4 min, respectivamente) en comparación con NO<sub>2</sub>HTy (13,4 min) indicaban un carácter más lipofílico que el precursor. Además, estos picos cromatográficos mostraron el mismo TR y espectro UV-vis que dos metil derivados de NO<sub>2</sub>HTy obtenidos de forma sintética y no desaparecieron tras el tratamiento con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa. Estos resultados junto al análisis por LC-MS permitieron finalmente confirmar su estructura como derivados monometilados, al proporcionar un ion [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 212 además del ión-fragmento a relación *m/z* 198, correspondiente al precursor NO<sub>2</sub>HTy.

En la Tabla 5.3 se indican todos los datos tanto cromatográficos como espectroscópicos de los compuestos identificados tras el metabolismo de NO<sub>2</sub>HTy (**49**) con células Caco-2.

**Tabla 5.3**  
Características cromatográficas y espectroscópicas de NO<sub>2</sub>HTy (**49**), NO<sub>2</sub>HTy-A (**50**) y NO<sub>2</sub>HTy-E (**59**) y los metabolitos formados tras su incubación con células Caco-2

Compuesto	PM	TR (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Ion fragmento (m/z)	Estructura propuesta
<b>49</b>	199	13,4	354, hombro a 308	198,0	150, 137	Nitrohidroxitirosol
<b>50</b>	241	32,9	354, hombro a 306	240,0	150	Acetato de nitrohidroxitirosilo
<b>59</b>	227	36,2	354, hombro a 312	226,0	151	Etil éter de nitrohidroxitirosilo
<b>M1</b>	375	9,1	330	374,0	198	Monoglucuronidado de 49
<b>M2</b>	375	9,3	290, hombro a 344	374,0	198	Monoglucuronidado de 49
<b>M3</b>	389	10,0	282, hombro a 332	388,0	374, 212, 198	Metilglucuronidado de 49
<b>M4</b>	389	14,0	292, hombro a 342	388,0	374, 212, 198	Metilglucuronidado de 49
<b>M5</b>	213	21,0	352, hombro a 306	212,0	198	Metil derivado de 49
<b>M6</b>	213	24,4	354, hombro a 306	212,0	198	Metil derivado de 49
<b>M7</b>	417	26,6	292, hombro a 342	416,0	240	Glucuronidado de 50
<b>M8</b>	403	29,2	292, hombro a 340	402,0	226	Monoglucuronidado de 59
<b>M9</b>	403	29,9	292, hombro a 344	402,0	226	Monoglucuronidado de 59
<b>M10</b>	417	31,0	326	416,0	240	Metilglucuronidado de 59
<b>M11</b>	417	32,2	286, hombro a 342	416,0	240	Metilglucuronidado de 59

PM: Peso molecular; TR: Tiempo de retención;  $\lambda_{\max}$ : longitud de onda del máximo de absorción; [M-H]<sup>-</sup>: Ion cuasimolecular; m/z: relación masa carga

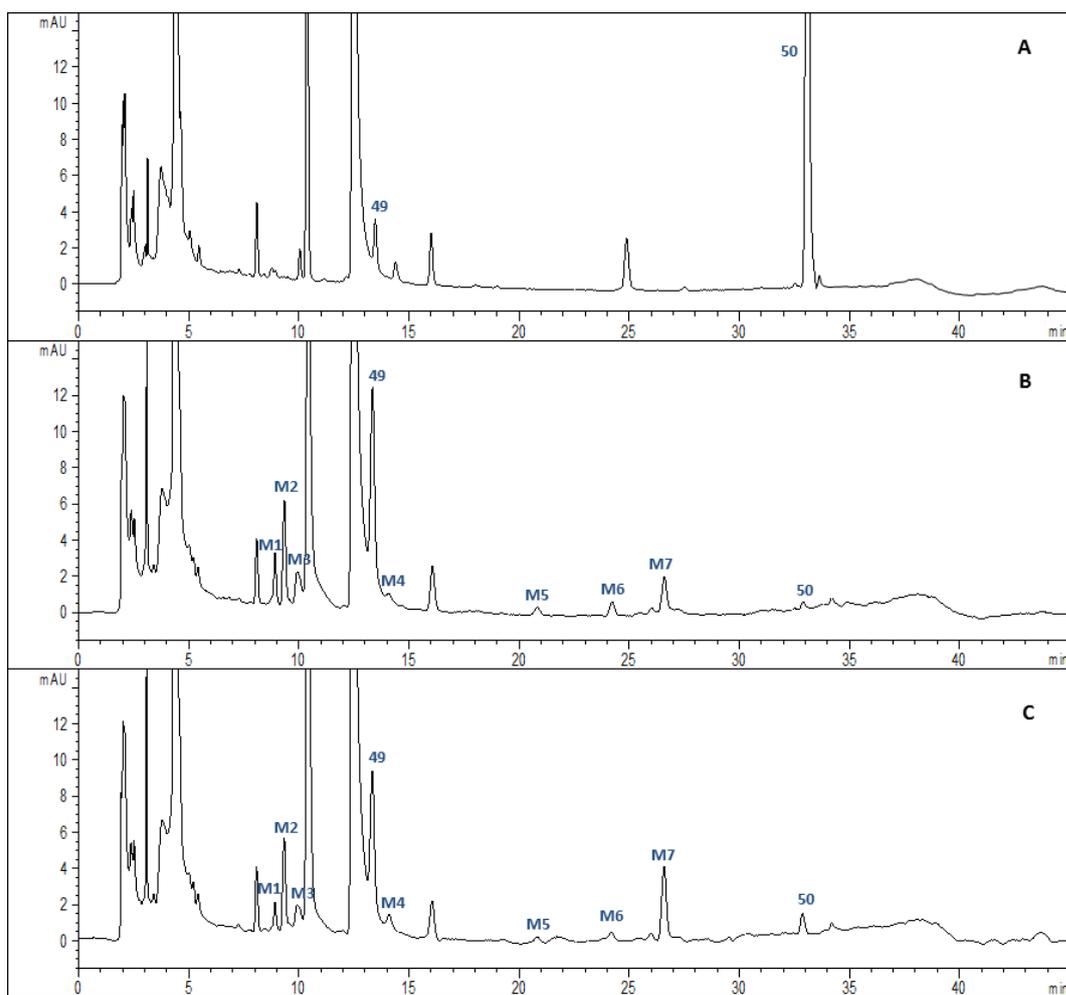
#### 5.3.1.2.2. Identificación de los metabolitos derivados de acetato de nitrohidroxitirosilo (**50**)

El análisis cromatográfico del compuesto objeto de estudio, NO<sub>2</sub>HTy-A, disuelto en medio de cultivo a 100  $\mu$ M previo a su incubación con las células Caco-2 (Figura 5.6, panel A), dio lugar a un pico intenso a TR de 32,9 min libre de interferencias con el resto de picos propios del medio.

Por otra parte, el perfil cromatográfico obtenido tras el análisis del medio de cultivo presente en el compartimento apical (Figura 5.6, Panel B) y basolateral (Figura 5.6, Panel C), que albergaba los metabolitos generados a partir de NO<sub>2</sub>HTy-A (**50**) en contacto con las células Caco-2, mostraba una gran coincidencia con lo descrito previamente para el compuesto **49**. Así, se

## 5. Resultados

detectaron seis picos M1, M2, M3, M4, M5 y M6 de idénticas características espectroscópicas y TR que aquellos derivados del metabolismo de **49** (Figura 5.5). Los ensayos complementarios para la identificación de metabolitos (síntesis *in vitro*, hidrólisis con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa y análisis por LC-MS) confirmó tratarse de los mismos derivados monoglucuronidados (picos M1 y M2), metilglucuronidados (M3 y M4) y monometilados de NO<sub>2</sub>HTy (picos M5 y M6), descritos en el apartado anterior (Tabla 5.3).



**Figura 5.6**

Perfiles cromatográficos a  $\lambda_{\text{max}}$  de 280 nm del compuesto acetato de nitrohidroxitiroso (NO<sub>2</sub>HTy-A, **50**) a concentración de 100  $\mu$ M disuelto en medio de cultivo (Panel A) y tras su incubación con células Caco-2 durante 4 horas en el compartimento apical (Panel B) y basolateral (Panel C)

Adicionalmente se detectó la presencia de un nuevo pico a 26,6 min con un espectro UV-vis indicativo de pertenecer al grupo de los nitroderivados (Ver anexo 9.5). Este pico etiquetado como M7, disminuyó significativamente tras el tratamiento con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa y tuvo lugar, de forma

concomitante, un incremento del área del compuesto parental (NO<sub>2</sub>HTy-A). Además, el análisis por LC-MS proporcionó un ion cuasimolecular [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 416 además del ion-fragmento a *m/z* 240, correspondiente al [NO<sub>2</sub>HTy-A]<sup>-</sup> tras la pérdida de 170 unidades de masa propio de un grupo glucurónido. Todos los ensayos permitieron la inequívoca identificación del pico cromatográfico M7 como un conjugado monoglucuronidado del compuesto **50** (Tabla 5.3).

#### 5.3.1.2.3. Identificación de los metabolitos derivados de etil nitrohidroxitirosil éter (**59**)

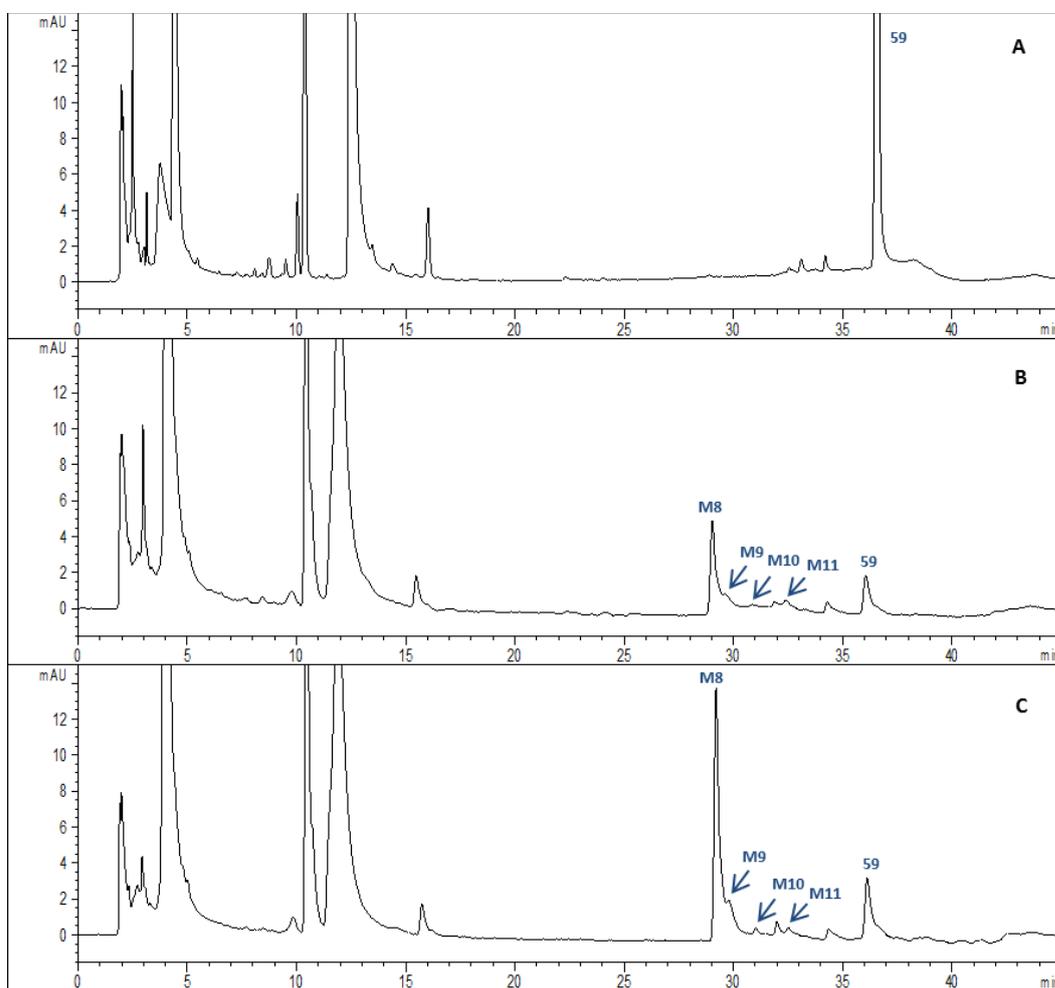
De igual modo que con los anteriores nitroderivados, se caracterizó cromatográficamente el patrón NO<sub>2</sub>HTy-E (**59**) disuelto en el medio de cultivo (Figura 5.7, Panel A), proporcionando un pico a TR de 36,2 min. El análisis por HPLC-DAD del medio de cultivo tras la incubación del derivado alquílico NO<sub>2</sub>HTy-E con las células Caco-2 durante 4 h, arrojó cuatro picos etiquetados como M8, M9, M10 y M11 (Figura 5.7, paneles B y C correspondientes al lado apical y basolateral, respectivamente) al margen del precursor (**59**). La síntesis *in vitro* de los derivados glucuronidados de NO<sub>2</sub>HTy-E dio lugar a dos picos coincidentes en TR y espectro UV-vis con M8 y M9. El resultado de la reacción de hidrólisis con la enzima β-glucuronidasa/sulfatasa (desaparición de M8 y M9) junto con el espectro de masas ([M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 402 e ion-fragmento a *m/z* 226) permitió la identificación de dos monoglucuronidados de NO<sub>2</sub>HTy-E (**59**). De forma semejante, los compuestos M10 y M11 desaparecieron por acción de la enzima β-glucuronidasa/sulfatasa sugiriendo la presencia de un grupo glucurónido, aunque el patrón de fragmentación por LC-MS difirió al mostrar un ion cuasimolecular [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 416 y un pico a *m/z* 240, con una diferencia respecto a los compuestos M8 y M9 de 14 unidades de masa, propio de un radical metilo. Así, se pudo confirmar la identidad de M10 y M11 como derivados metilglucuronidados de NO<sub>2</sub>HTy-E (Ver Tabla 5.3).

En general, no se obtuvieron conjugados sulfatados para ninguno de los tres nitrocatecoles tras su incubación con las células Caco-2.

Los contenidos citoplasmáticos no mostraron ningún metabolito adicional a los descritos.

## 5. Resultados

Los espectros de masas de todos los compuestos identificados del metabolismo de los nitrocatecoles se adjuntan en el anexo 9.4.



**Figura 5.7**

Perfiles cromatográficos a  $\lambda_{\max}$  de 280 nm del compuesto etil éter de nitrohidroxitirosilo ( $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ , **59**) a concentración de  $100 \mu\text{M}$  disuelto en medio de cultivo (Panel A) y tras su incubación con células Caco-2 durante 4 horas en el compartimento apical (Panel B) y basolateral (Panel C)

### 5.3.1.3. Transporte transepitelial de los nitrocatecoles a través de la monocapa diferenciada de células Caco-2

El estudio del transporte de los nitrocatecoles a través de la monocapa de células Caco-2 permitió determinar el sentido dominante de transferencia, absorción o eflujo. A partir del coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{\text{aap}}$ ), expresado en  $\text{cm}^2/\text{s}$ , se cuantificó la velocidad de transferencia en el sentido entrada desde la barrera trans-intestinal a la circulación portal (apical (AP)-basolateral (BL)) y de salida (BL-AP), mediante experimentos independientes, incubando el compuesto en el compartimento contrario al de la transferencia.

Los valores Papp se calcularon a partir de los datos resultantes de la incubación durante 1h, dado que se ha descrito que tiene lugar un transporte lineal a períodos cortos de incubación y los metabolitos en general, representan una cantidad pequeña (Artursson y Karlsson, 1991). En la tabla 5.4 se indican los valores del coeficiente Papp para los transportes en ambos sentidos (AP-BL y BL-AP), así como la relación entre ellos que informa sobre el índice de absorción (IA) ( $P_{appAP-BL}/P_{appBL-AP}$ ) de los compuestos NO<sub>2</sub>HTy (**49**), NO<sub>2</sub>HTy-A (**50**) y NO<sub>2</sub>HTy-E (**59**) en células Caco-2. Los resultados muestran que, aunque los tres compuestos se transportan en ambos sentidos, las mayores velocidades de entrada que de salida ( $P_{appAP-BL} > P_{appBL-AP}$ ) confirman un sentido preferente de entrada y por tanto, que son biodisponibles a nivel intestinal. Ahora bien, los compuestos lipofílicos (NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) mostraron un coeficiente de IA similar y significativamente mayor que el calculado para el compuesto más polar, el precursor NO<sub>2</sub>HTy, lo que permite establecer una relación directa entre el grado de absorción y el carácter lipofílico del compuesto.

**Tabla 5.4**

Valores del coeficiente de permeabilidad aparente de entrada desde el compartimento apical al basolateral ( $P_{appAP-BL}$ ) y de salida desde el compartimento basolateral al apical ( $P_{appBL-AP}$ ) así como el índice de absorción (IA), determinado como el cociente ( $P_{appAP-BL}/P_{appBL-AP}$ ). Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones

Compuesto	AP – BL (Papp, x 10 <sup>-6</sup> cm/s)	BL – AP (Papp, x 10 <sup>-6</sup> cm/s)	Índice de absorción (IA)
<b>49</b>	47,7 $\pm$ 0,8	44,1 $\pm$ 1,9	1,1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
<b>50</b>	75,3 $\pm$ 0,4	52,9 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
<b>59</b>	75,1 $\pm$ 0,3	48,8 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>

**49:** Nitrohidroxitirosol. **50:** Acetato de nitrohidroxitirosilo. **59:** Éter etílico de nitrohidroxitirosilo.  
AP: Apical. BL: Basolateral. Papp: Coeficiente de permeabilidad aparente.  
Diferente letra indica que los valores son diferentes estadísticamente ( $p < 0,05$ )

#### 5.3.1.4. Cuantificación de los metabolitos derivados de NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E

En la Tabla 5.5 se indican los porcentajes de los distintos nitrocatecoles y metabolitos cuantificados en ambos compartimentos apical y basolateral del transwell a los distintos tiempos de incubación apical (1, 2 y 4 horas), utilizando la recta de calibrado del respectivo compuesto parental.

## 5. Resultados

Los resultados muestran una relación directa entre el tiempo de incubación y la cantidad transferida a través de la monocapa Caco-2, basado en los contenidos crecientes cuantificados en el compartimento basolateral a lo largo del tiempo.

Comparando los tres nitrocatecoles, el porcentaje total de compuestos, parental y metabolitos, en el compartimento basolateral tras una incubación de 4 h fue mayor para aquellos más lipofílicos (50,14 y 52,55% correspondiente a NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E, respectivamente) que para el precursor NO<sub>2</sub>HTy (29,99%), de acuerdo al mayor transporte descrito para los compuestos NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E.

Respecto a la fracción absorbida, gran parte de la cantidad del compuesto NO<sub>2</sub>HTy permaneció sin metabolizar (80,76% a las 2 horas de incubación), mientras que los compuestos más grasos alteraron la proporción, registrando sólo valores de 17,30 y 32,94% para NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E, respectivamente (Tabla 5.5 y Figura 5.8). Ahora bien, cabe destacar para el caso del derivado acetilado, NO<sub>2</sub>HTy-A, que gran parte de los metabolitos identificados en el compartimento basolateral correspondían al producto NO<sub>2</sub>HTy, generado tras su hidrólisis, y que permanecía sin conjugarse. Si consideramos el compuesto NO<sub>2</sub>HTy como parental, al no proceder de la acción de enzimas de fase II y lo sumamos al contenido de NO<sub>2</sub>HTy-A, el porcentaje de compuesto que se absorbe y permanece sin metabolizar ascendería a un 71,22% para NO<sub>2</sub>HTy-A. Estos resultados muestran que una porción importante de los nitrocatecoles, en particular NO<sub>2</sub>HTy y NO<sub>2</sub>HTy-A, escapan del metabolismo durante su transporte al compartimento basolateral, alcanzando el torrente sanguíneo como compuesto parental.

Respecto a la naturaleza de los metabolitos, la mayor parte fueron derivados glucuronidados, seguidos de los metil glucuronidados y en último lugar los metil derivados.

**Tabla 5.5**

Porcentajes de compuesto parental (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y metabolitos cuantificados en el compartimento apical (AP) y basolateral (BL) tras su incubación apical durante 1, 2 y 4 h con las células Caco-2

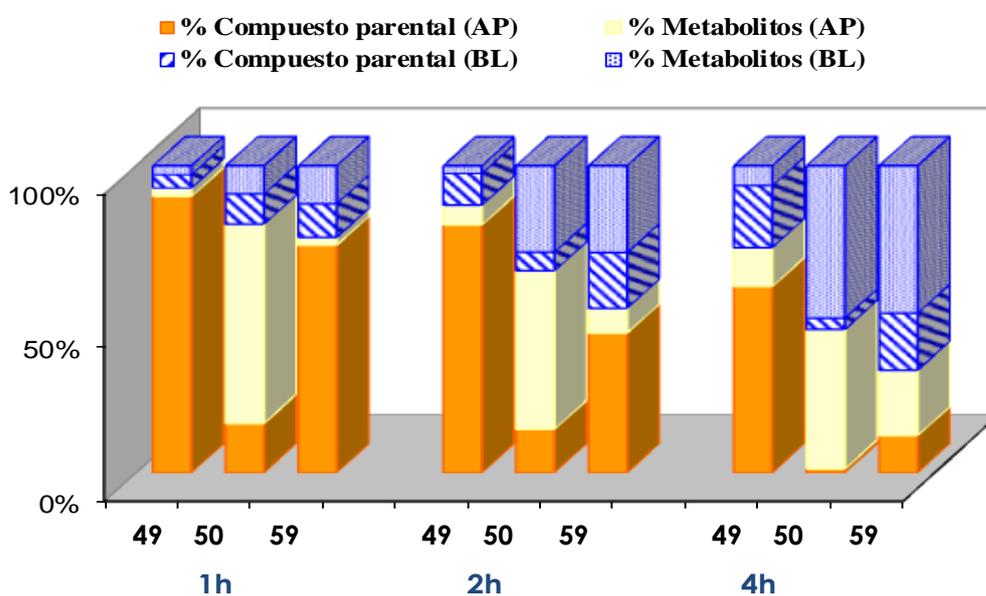
			1 h	2 h	4 h	
<b>% Compuestos identificados tras carga apical en células Caco-2</b>						
NO <sub>2</sub> HTy	AP	<b>Compuesto Parental</b>	<b>88,19</b>	<b>81,92</b>	<b>61,23</b>	
		Glucuronidados	2,77	3,43	6,01	
		Metilglucuronidados	0,00	0,00	0,91	
		Metilados	1,83	1,76	1,86	
		<b>% Metabolitos</b>	<b>4,60</b>	<b>5,19</b>	<b>8,78</b>	
		<b>% Total</b>	<b>92,79</b>	<b>87,11</b>	<b>70,01</b>	
		BL	<b>Compuesto Parental</b>	<b>4,16</b>	<b>10,41</b>	<b>21,85</b>
	Glucuronidados		3,05	2,48	4,91	
	Metilglucuronidados		0,00	0,00	1,21	
	Metilados		0,00	0,00	2,02	
	<b>% Metabolitos</b>		<b>3,05</b>	<b>2,48</b>	<b>8,14</b>	
	<b>% Total</b>		<b>7,21</b>	<b>12,89</b>	<b>29,99</b>	
	NO <sub>2</sub> HTy-A		AP	<b>Compuesto Parental</b>	<b>15,85</b>	<b>15,84</b>
		Glucuronidados		3,76	7,24	13,54
Metilglucuronidados		0,00		0,70	1,23	
Metilados		0,00		1,44	2,49	
NO <sub>2</sub> HTy		61,25		39,01	31,16	
<b>% Metabolitos</b>		<b>65,01</b>		<b>48,39</b>	<b>48,42</b>	
<b>% Total</b>		<b>80,86</b>		<b>64,23</b>	<b>49,86</b>	
BL		<b>Compuesto Parental</b>	<b>9,64</b>	<b>6,19</b>	<b>4,04</b>	
		Glucuronidados	3,16	10,22	18,34	
		Metilglucuronidados	0,00	0,00	1,25	
		Metilados	0,00	0,07	1,86	
		NO <sub>2</sub> HTy	6,34	19,29	24,65	
		<b>% Metabolitos</b>	<b>9,50</b>	<b>29,58</b>	<b>46,10</b>	
		<b>% Total</b>	<b>19,14</b>	<b>35,77</b>	<b>50,14</b>	
NO <sub>2</sub> HTy-E	AP	<b>Compuesto Parental</b>	<b>76,31</b>	<b>44,40</b>	<b>12,97</b>	
		Glucuronidados	2,58	6,57	30,23	
		Metilglucuronidados	0,00	1,24	4,24	
		<b>% Metabolitos</b>	<b>2,58</b>	<b>7,81</b>	<b>34,47</b>	
		<b>% Total</b>	<b>78,89</b>	<b>52,21</b>	<b>47,44</b>	
		BL	<b>Compuesto Parental</b>	<b>10,73</b>	<b>15,75</b>	<b>11,54</b>
			Glucuronidados	10,38	29,66	36,23
	Metilglucuronidados		0,00	2,38	4,79	
	<b>% Metabolitos</b>		<b>10,38</b>	<b>32,04</b>	<b>41,02</b>	
	<b>% Total</b>		<b>21,11</b>	<b>47,79</b>	<b>52,56</b>	

El contenido intracelular mostró niveles tanto de los metabolitos como de los compuestos parentales por debajo del límite de detección, lo que sugiere

## 5. Resultados

la no acumulación intracelular de estos fenoles en los tiempos de incubación analizados.

Como apoyo a la tabla 5.5, en la Figura 5.8 se representan las proporciones de los compuestos de estudio y sus metabolitos presentes en ambos compartimentos apical y basolateral del transwell, tras la incubación con las células Caco-2 a concentración de 100  $\mu\text{M}$  a los distintos tiempos de incubación. Los compuestos identificados en el compartimento apical se muestran con colores lisos y aquellos hallados en el compartimento basolateral con colores rayados.



**Figura 5.8**

Porcentajes relativos de los compuestos parentales y metabolitos de los compuestos nitroderivados (**49**: NO<sub>2</sub>HTy; **50**: NO<sub>2</sub>HTy-A; **59**: NO<sub>2</sub>HTy-E), hallados en el compartimento apical (AP) y/o basolateral (BL) tras 1, 2 y 4 h de incubación con células Caco-2 tras una carga apical. El total del recuento de las fracciones metabolizadas y no metabolizadas en ambos compartimentos representa el 100%.

Los resultados obtenidos del estudio de la biodisponibilidad intestinal permiten confirmar que los nitrocatecoles se absorben de forma proporcional al tiempo de incubación y naturaleza lipofílica del compuesto.

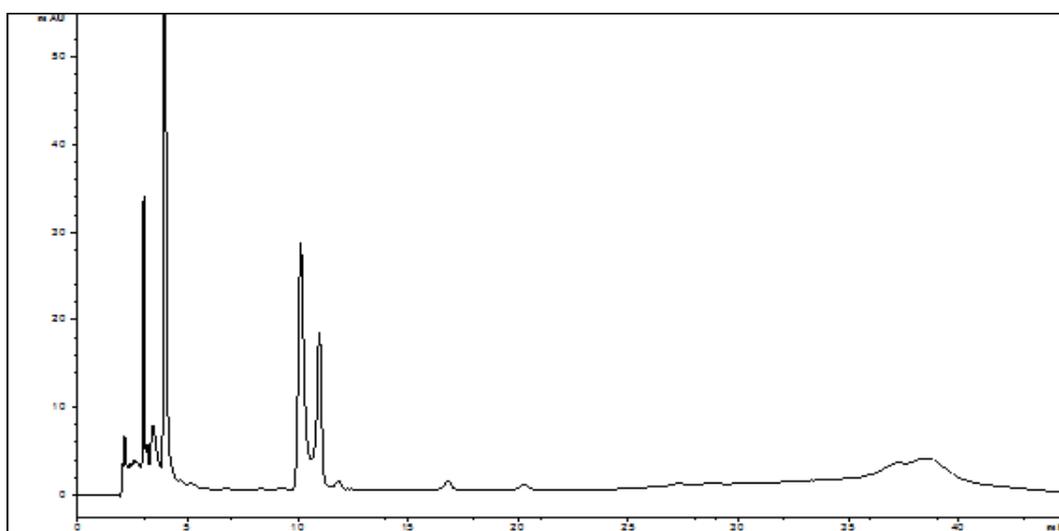
### 5.3.2. Biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos *in vitro* en células HepG2

Se ha estudiado el metabolismo de NO<sub>2</sub>HTy (**49**), NO<sub>2</sub>HTy-A (**50**) y NO<sub>2</sub>HTy-E (**59**) en un sistema modelo *in vitro* con células de hepatoma humano, HepG2, por el interés de ahondar en el metabolismo de los compuestos que son absorbidos sin metabolizar a través del epitelio intestinal.

#### 5.3.2.1. Metabolismo hepático de los nitrocatecoles

El modelo y las condiciones utilizadas para evaluar la biodisponibilidad de los nitrocatecoles, se basó en estudios previos realizados con fenoles del AOV (HTy, Ty y HTy-A) por el equipo de investigación (Mateos y cols., 2005b).

En primer lugar se evaluó el medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de las células HepG2 por HPLC-DAD, para conocer sus componentes y evitar interferencias con los nitroderivados de HTy y sus metabolitos (Figura 5.9). Así, se detectaron dos picos dominantes a TR de 10,1 y 10,9 min junto con otros tres picos a TR de 11,5, 17,1 y 20,3 min de menor intensidad.



**Figura 5.9**

Perfil cromatográfico a  $\lambda_{\max}$  de 280 nm del medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de las células HepG2

Los experimentos se realizaron con 100  $\mu\text{M}$  de cada compuesto fenólico disuelto en agua con una pequeña proporción de DMSO para favorecer la disolución del compuesto más lipofílico, además de 300  $\mu\text{M}$  de ácido

## 5. Resultados

ascórbico para protegerlo de la oxidación. Los fenoles se incubaron con las células HepG2 durante 2 y 18 horas para evaluar una posible relación tiempo dependiente con el rendimiento de la metabolización.

Todos los medios del cultivo que estuvieron en contacto con las células HepG2, además del contenido citoplasmático, se caracterizaron por HPLC-DAD a la  $\lambda_{\max}$  de 280 nm. En general, además de los picos propios del medio de cultivo se detectaron nuevos picos cromatográficos que sugerían la formación de metabolitos derivados del metabolismo de los nitrocatecoles por acción de las células HepG2. Gran parte de ellos coincidieron con los descritos en los estudios llevados a cabo con células Caco-2, a excepción de dos metabolitos (M12 y M13). Todos los compuestos se identificaron y caracterizaron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en el apartado 5.3.1.2: reacciones de conjugación *in vitro* de los compuestos estándares puros, hidrólisis enzimática de los metabolitos y confirmación de las estructuras por LC-MS. En la Tabla 5.6 se recogen las características cromatográficas y espectroscópicas de los metabolitos identificados.

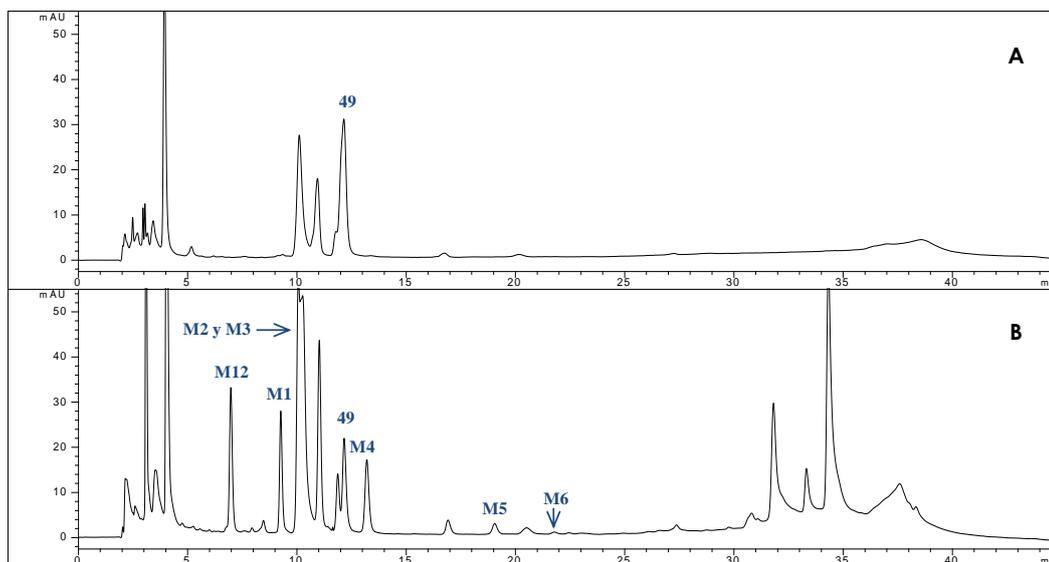
### 5.3.2.2. Identificación y caracterización del metabolismo de los nitrocatecoles

#### 5.3.2.2.1. Identificación de los metabolitos derivados de nitrohidroxitirosol (**49**)

El análisis cromatográfico del compuesto objeto de estudio, NO<sub>2</sub>HTy, disuelto en medio de cultivo a 100  $\mu$ M previo a su incubación con las células HepG2 (Figura 5.10, panel A), dio lugar a un pico intenso (**49**) a TR de 12,2 min libre de interferencias con el resto de picos del medio.

El metabolismo de NO<sub>2</sub>HTy tras la incubación con las células durante 18 h se caracterizó por la presencia en el medio de cultivo de un total de siete picos, presuntamente metabolitos, tras evaluar el espectro UV-vis (Figura 5.10, panel B). Las pruebas conducentes a la identificación de estos picos permitieron confirmar la identidad de los metabolitos M1 y M2 como derivados glucuronidados, M3 y M4 como derivados metilglucuronidados y M5 y M6 como metil conjugados de NO<sub>2</sub>HTy, todos ellos ya descritos en los estudios de transporte y metabolismo con las células Caco-2. Adicionalmente, se obtuvo un nuevo pico etiquetado como M12 que desapareció tras practicar la

hidrólisis con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa. El patrón de fragmentación por LC-MS mostró un ion cuasimolecular  $[M-H]^-$  a  $m/z$  550 y dos iones-fragmento a  $m/z$  374 y 198, tras perder uno y dos grupos glucurónidos, respectivamente, confirmando así la identidad de M12 como un derivado diglucuronidado de NO<sub>2</sub>HTy (**49**).



**Figura 5.10**

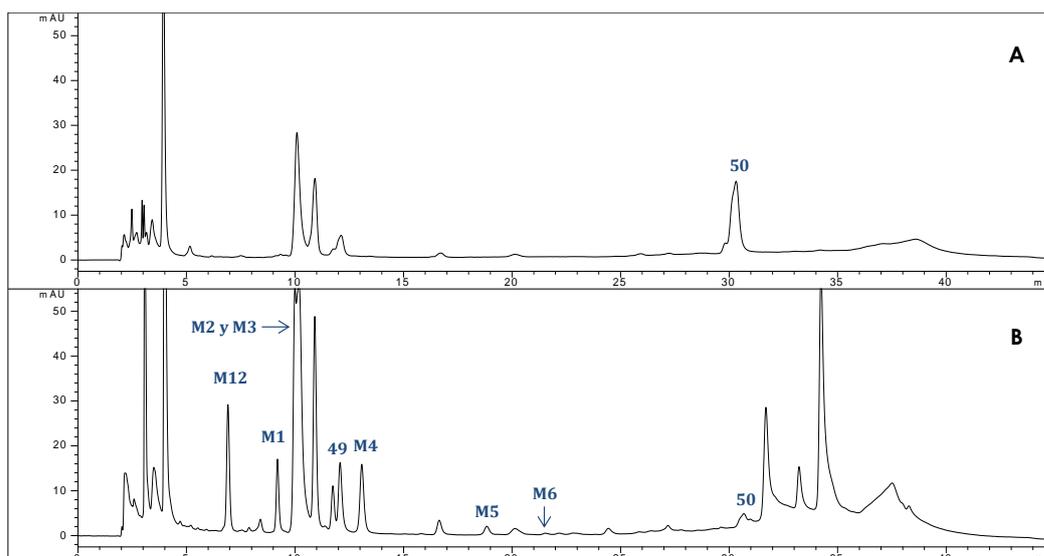
Perfiles cromatográficos a  $\lambda_{\max}$  de 280 nm del compuesto nitrohidroxitirosol (**49**) a concentración de 100  $\mu$ M disuelto en medio de cultivo (Panel A) y tras su incubación con células HepG2 durante 18 horas (Panel B)

#### 5.3.2.2.2. Identificación de los metabolitos derivados de acetato de nitrohidroxitirosilo (NO<sub>2</sub>HTy-A, **50**)

La caracterización cromatográfica del compuesto NO<sub>2</sub>HTy-A (**50**) disuelto en el medio de cultivo a la concentración de trabajo 100  $\mu$ M, mostró un intenso pico a TR de 30,3 min (Figura 5.11, panel A) y que no coelúa con el resto de los picos inherentes al medio ya descritos.

Por otra parte, el análisis cromatográfico del medio de cultivo (Figura 5.11, Panel B) procedente del metabolismo de NO<sub>2</sub>HTy-A con las células HepG2, resultó ser idéntico al descrito para el compuesto NO<sub>2</sub>HTy (Ver Figura 5.10, Panel B), al mostrar de nuevo los metabolitos M1-M6 y M12. Estos resultados evidencian la hidrólisis extensiva que sufre el derivado acílico a su precursor, el compuesto NO<sub>2</sub>HTy, que a su vez continúa la ruta metabólica propia de las enzimas de fase II, generando los ya caracterizados derivados diglucuronidados, glucuronidados, metilados y metilglucuronidados.

## 5. Resultados

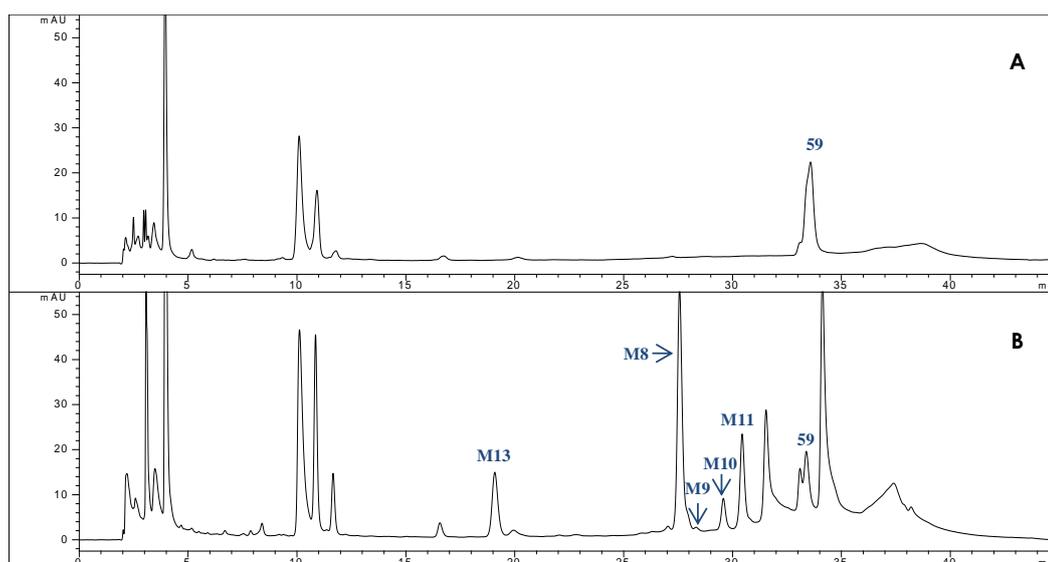


**Figura 5.11**

Perfiles cromatográficos a  $\lambda_{\max}$  de 280 nm del compuesto acetato de nitrohidroxitirosilo (**50**) a concentración de 100  $\mu\text{M}$  disuelto en medio de cultivo (Panel A) y tras su incubación con células HepG2 durante 18 horas (Panel B)

### 5.3.2.2.3. Identificación de los metabolitos derivados de etil nitrohidroxitirosil éter ( $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ , **59**)

De igual modo que con los anteriores nitroderivados, se caracterizó cromatográficamente el patrón  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$  (**59**) disuelto en el medio de cultivo (Figura 5.12, Panel A, TR a 33,8 min). Por otro lado, el análisis por HPLC-DAD del medio de cultivo tras la incubación del derivado alquílico  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$  con las células HepG-2 durante 18 h dio lugar a cinco picos etiquetados como M8-M11 y M13 (Figura 5.12, panel B). M8-M11 mostraron las mismas características cromatográficas y espectroscópicas que aquellos metabolitos previamente descritos para el metabolismo de  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$  con las células Caco-2, donde M8 y M9 eran los derivados glucuronidados mientras que M10 y M11 los metil derivados de  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ . Respecto al nuevo metabolito M13, su desaparición tras practicar la reacción de hidrólisis con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa junto con el espectro de masas ( $[\text{M-H}]^-$  a  $m/z$  578 y dos iones-fragmento a  $m/z$  402 y 226) permitió la identificación de M13 como un derivado diglucuronidado de  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ .



**Figura 5.12**  
Perfiles cromatográficos a  $\lambda_{\text{max}}$  de 280 nm del compuesto etil nitrohidroxitirosil éter (**59**) a concentración de 100  $\mu\text{M}$  disuelto en medio de cultivo (Panel A) y tras su incubación con células HepG2 durante 18 horas (Panel B)

**Tabla 5.6**  
Características cromatográficas y espectroscópicas de  $\text{NO}_2\text{HTy}$  (**49**),  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$  (**50**) y  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$  (**59**) y los metabolitos formados tras su incubación con células HepG2

Compuesto	PM	TR (min)	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$[\text{M}-\text{H}]^-$ (m/z)	Ion fragmento (m/z)	Estructura propuesta
<b>49</b>	199	12,2	354, hombro a 308	198,0	150, 137	Nitrohidroxitirosol
<b>50</b>	241	30,3	354, hombro a 306	240,0	150	Acetato de nitrohidroxitirosilo
<b>59</b>	227	33,8	354, hombro a 312	226,0	151	Etil éter de nitrohidroxitirosilo
<b>M12</b>	551	7,1	290	550,0	374,198	Diglucuronidado de 49
<b>M1</b>	375	9,3	330	374,0	198	Monoglucuronidado de 49
<b>M2</b>	375	10,2	290, hombro a 344	374,0	198	Monoglucuronidado de 49
<b>M3</b>	389	10,6	282, hombro a 332	388,0	374, 212, 198	Metilglucuronidado de 49
<b>M4</b>	389	13,2	292, hombro a 342	388,0	374, 212, 198	Metilglucuronidado de 49
<b>M5</b>	213	18,8	352, hombro a 306	212,0	198	Metil derivado de 49
<b>M6</b>	213	21,3	354, hombro a 306	212,0	198	Metil derivado de 49
<b>M8</b>	403	27,5	292, hombro a 340	402,0	226	Monoglucuronidado de 59
<b>M9</b>	403	28,3	292, hombro a 344	402,0	226	Monoglucuronidado de 59
<b>M10</b>	417	29,7	326	416,0	240	Metilglucuronidado de 59
<b>M11</b>	417	30,5	286, hombro a 342	416,0	240	Metilglucuronidado de 59
<b>M13</b>	579	19,2	288	578,0	402, 226	Diglucuronidado de 59

PM: Peso molecular; TR: Tiempo de retención;  $[\text{M}-\text{H}]^-$ : Ion cuasimolecular

## 5. Resultados

No se identificaron conjugados sulfatados para ninguno de los tres nitrocatecoles tras su incubación con las células HepG2. En los contenidos citoplasmáticos, sólo se detectaron trazas de aquellos metabolitos mayoritarios y no se identificó ningún compuesto adicional a los descritos.

Los espectros de masas y UV-vis se recogen en los anexos 9.4 y 9.5.

Las posibles diferencias observadas en el TR tanto para los patrones como los metabolitos comunes caracterizados en los dos estudios de biodisponibilidad, intestinal y hepático, se deben al uso de dos equipos cromatográficos diferentes aunque con iguales especificaciones técnicas (Agilent Serie 1200), a pesar de trabajar con la misma columna e idénticas condiciones cromatográficas.

### 5.3.2.3. Cuantificación del metabolismo de los nitrocatecoles tras 2 y 18 h de incubación con células HepG2. Análisis comparativo.

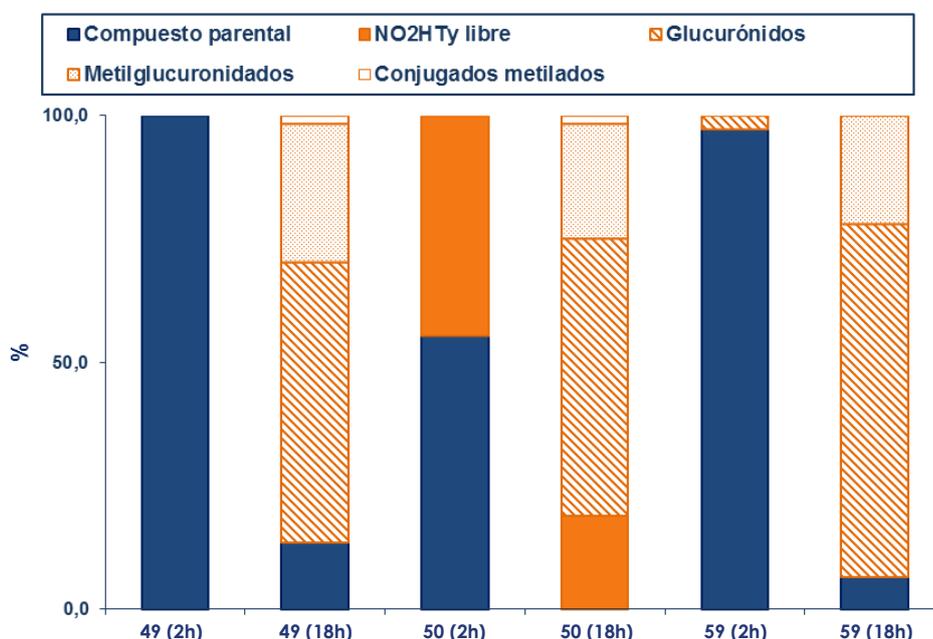
Se ha llevado a cabo la cuantificación de los compuestos nitroderivados y sus metabolitos en el medio de cultivo extracelular tras 2 y 18 h en contacto con las células HepG2 (Figura 5.13). En esta ocasión sólo se muestra la figura y no la tabla con el ánimo de simplificar la presentación de los resultados. El porcentaje de los compuestos detectados sin metabolizar en el medio de cultivo tras 2 horas correspondió a un 100%, 60,6% y 97,3% para NO<sub>2</sub>HTy (**49**), NO<sub>2</sub>HTy-A (**50**) y NO<sub>2</sub>HTy-E (**59**), respectivamente. Estos datos evidencian una absorción y metabolización limitada a tiempos cortos de incubación. El mayor porcentaje obtenido para el derivado acetilado, NO<sub>2</sub>HTy-A, es debido a la extensa hidrólisis que sufre para generar el precursor NO<sub>2</sub>HTy. Sin embargo no se identificaron metabolitos derivados de la acción de las enzimas de fase II para los compuestos NO<sub>2</sub>HTy y NO<sub>2</sub>HTy-A. Por el contrario, el compuesto NO<sub>2</sub>HTy-E generó un derivado glucuronidado que representó un 2,7 % del total.

La incubación tras 18 h ofreció un perfil metabólico completamente distinto, como se desprende de las pequeñas fracciones de los compuestos parentales sin metabolizar, 11,9%, 0,0% y 6,3% para NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E, respectivamente (Figura 5.13). Los tres compuestos fueron biotransformados por acción de las enzimas de fase II, en particular UDP-glucuronosiltransferasa y COMT, para generar derivados glucuronidados, metilados y/o metilglucuronidados, principalmente. La extensa hidrólisis que

sufrió el compuesto NO<sub>2</sub>HTy-A a su precursor NO<sub>2</sub>HTy a diferencia del derivado alquílico, marca la principal diferencia entre ambos, *a priori* con parecido coeficiente de absorción. En cuanto a la proporción de metabolitos identificados, cabe destacar la mayor proporción de derivados glucuronidados generados del metabolismo del compuesto NO<sub>2</sub>HTy-E frente a los otros nitroderivados (72,0%, 56,0% y 57,1% para NO<sub>2</sub>HTy-E, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy, respectivamente), contrario a lo que ocurre con los derivados metilados (0,0%, 1,5%, 1,5% para NO<sub>2</sub>HTy-E, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy, respectivamente).

Por otro lado, no se cuantificaron metabolitos en los lisados celulares, hallándose únicamente trazas de los compuestos parentales y metabolitos para ambos tiempos de incubación. Este hecho sugiere de nuevo la limitada acumulación intracelular de todos los compuestos.

Los resultados confirmaron la absorción y gran metabolización de los nitroderivados por las células HepG2, directamente proporcional al tiempo de incubación y naturaleza lipofílica del compuesto, probablemente por la mayor facilidad de atravesar la bicapa lipídica de la membrana.



**Figura 5.13**

Porcentajes relativos de los compuestos de estudio (**49**: NO<sub>2</sub>HTy; **50**: NO<sub>2</sub>HTy-A; **59**: NO<sub>2</sub>HTy-E), hallados en el medio de cultivo extracelular tras 2 y 18 h de incubación con células HepG2 en presencia de 100 μM de los compuestos nitroderivados

#### 5.4. Evaluación de la capacidad antioxidante y neuroprotectora de los nitroderivados de HTy en modelos experimentales de daño cerebral

Con el fin de evaluar el efecto neuroprotector de NO<sub>2</sub>HTy (**49**) y los nitroderivados lipofílicos seleccionados, acetato de nitrohidroxitirosilo (NO<sub>2</sub>HTy-A, **50**) y éter etílico de nitrohidroxitirosilo (NO<sub>2</sub>HTy-E, **59**), se llevaron a cabo distintas determinaciones que abarcaron estudios *in vitro* y *ex vivo*. Todos ellos estuvieron encaminados al estudio de la capacidad antioxidante y la posible relación con el efecto neuroprotector que estos compuestos fenólicos presentan en un sistema biológico como es el animal de experimentación. Asimismo, se emplearon con fines comparativos el compuesto de referencia antioxidante hidroxitirosol (HTy) y los análogos lipofílicos, acetato de hidroxitirosilo (HTy-A) y éter etílico de hidroxitirosilo (HTy-E), a fin de valorar la capacidad antioxidante y las diferencias entre ambas series de nitrocatecoles y catecoles.

##### 5.4.1. Resultados correspondientes a los experimentos *in vitro*

###### 5.4.1.1. Resultados de las variables del tejido cerebral sometido a inducción química

###### 5.4.1.1.1. Resultados de las variables de estrés oxidativo en tejido

###### 5.4.1.1.1.1. Determinación de la peroxidación lipídica

Se determinaron los valores de TBARS a fin de valorar el proceso de peroxidación lipídica en el tejido sin inducir.

En la Tabla 5.7 se muestran los valores de peroxidación lipídica sin inducción química del tejido e incubación con los diferentes compuestos fenólicos, serie nitrocatecol (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y serie catecol (HTy, HTy-A y HTy-E), en un rango de concentraciones creciente (0,1-500 μM). Los TBARS se representan con el valor medio y error estándar (media ± EEM).

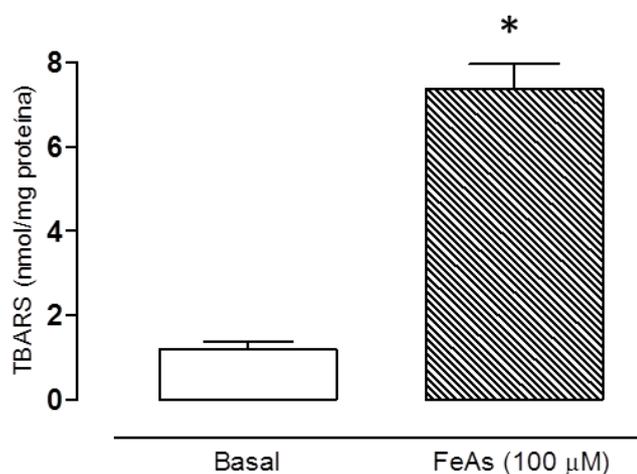
**Tabla 5.7**

Valores (Media  $\pm$  EEM) de **TBARS** ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteína) en tejido cerebral tras la incubación con diferentes concentraciones de los derivados nitrocatecoles ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ ,  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$  y  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ ) y catecoles ( $\text{HTy}$ ,  $\text{HTy-A}$  y  $\text{HTy-E}$ )

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$\text{NO}_2\text{HTy}$	$\text{NO}_2\text{HTy-A}$	$\text{NO}_2\text{HTy-E}$	$\text{HTy}$	$\text{HTy-A}$	$\text{HTy-E}$
0	1,15 $\pm$ 0,05	1,15 $\pm$ 0,05	1,15 $\pm$ 0,05	3,99 $\pm$ 0,38	3,99 $\pm$ 0,38	3,99 $\pm$ 0,38
0,1	1,17 $\pm$ 0,06	1,18 $\pm$ 0,04	1,20 $\pm$ 0,08	3,97 $\pm$ 0,41	3,98 $\pm$ 0,33	3,16 $\pm$ 0,36
1	1,18 $\pm$ 0,06	1,08 $\pm$ 0,16	1,19 $\pm$ 0,08	3,88 $\pm$ 0,45	4,00 $\pm$ 0,44	3,18 $\pm$ 0,54
5	1,16 $\pm$ 0,07	1,21 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,06	3,29 $\pm$ 0,08	3,21 $\pm$ 0,08	3,25 $\pm$ 0,67
10	1,19 $\pm$ 0,09	1,17 $\pm$ 0,04	1,23 $\pm$ 0,09	3,84 $\pm$ 0,31	3,82 $\pm$ 0,55	3,11 $\pm$ 0,45
50	1,22 $\pm$ 0,06	1,16 $\pm$ 0,03	1,18 $\pm$ 0,08	3,49 $\pm$ 0,70	3,75 $\pm$ 0,57	3,21 $\pm$ 0,65
100	1,12 $\pm$ 0,05	1,20 $\pm$ 0,03	1,21 $\pm$ 0,06	3,70 $\pm$ 0,49	3,09 $\pm$ 0,18	3,24 $\pm$ 0,28
500	1,11 $\pm$ 0,06	1,21 $\pm$ 0,06	1,23 $\pm$ 0,05	3,66 $\pm$ 0,46	3,21 $\pm$ 0,22	3,25 $\pm$ 0,39

$\text{NO}_2\text{HTy}$ : Nitrohidroxitirosol.  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$ : Acetato de nitrohidroxitirosilo.  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ : Éter efílico de nitrohidroxitirosilo.  $\text{HTy}$ : Hidroxitirosol.  $\text{HTy-A}$ : Acetato de hidroxitirosilo.  $\text{HTy-E}$ : Éter efílico de hidroxitirosilo. TBARS: Productos de reacción con ácido tiobarbitúrico

En un primer apartado de inducción química, se indujo el daño oxidativo en el tejido animal con FeAs (100  $\mu\text{M}$ ) permitiendo así cuantificar el índice de peróxidos lipídicos formados en su comparación con el tejido sin inducir (Figura 5.14).



\* $p < 0,0001$  respecto al valor basal

**Figura 5.14**

Cuantificación de los productos de reacción con ácido tiobarbitúrico (TBARS) en tejido sometido a inducción química con sulfato ferroso y ácido ascórbico (FeAs) respecto a valores en tejido no inducido

En la Tabla 5.8 se muestran los valores de peroxidación lipídica tras un proceso de inducción química del tejido (FeAs, 100  $\mu\text{M}$ ) e incubación con los

## 5. Resultados

diferentes compuestos fenólicos, serie nitrocatecol (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y serie catecol (HTy, HTy-A y HTy-E), en un rango de concentraciones creciente (0,1-500 μM). Los valores de TBARS se representan con el valor medio y error estándar (media ± SEM).

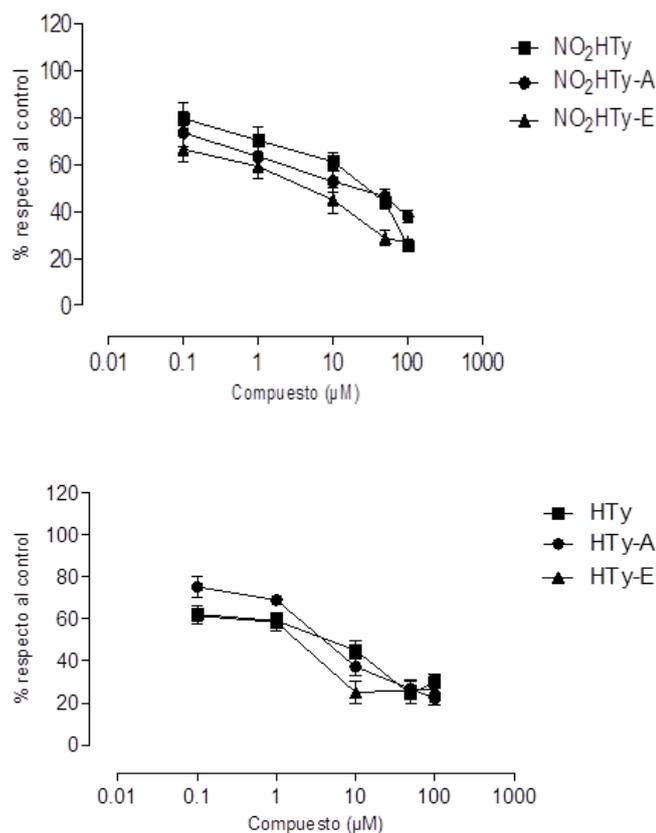
**Tabla 5.8**

Valores (media ± EEM) de **TBARS** (μmol/mg proteína) en tejido cerebral inducido químicamente con Fe/Vit C, tras la incubación con diferentes concentraciones de los derivados nitrocatecoles (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E)

Concentración (μM)	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E	HTy	HTy-A	HTy-E
0	2,30 ± 0,16	2,44 ± 0,11	2,43 ± 0,13	2,30 ± 0,16	2,44 ± 0,11	2,43 ± 0,13
0 + FeAs	7,37 ± 0,12	7,37 ± 0,12	7,37 ± 0,12	7,37 ± 0,12	7,37 ± 0,12	7,37 ± 0,12
0,1	5,87 ± 0,36	5,42 ± 0,11	4,90 ± 0,52	4,59 ± 0,32	5,55 ± 0,21	4,53 ± 0,25
1	5,18 ± 0,68	4,67 ± 0,29	4,39 ± 0,40	4,36 ± 0,27	5,09 ± 0,36	4,31 ± 0,38
5	4,96 ± 0,21	3,18 ± 0,24	3,25 ± 0,20	4,99 ± 0,23	4,73 ± 0,20	4,15 ± 0,51
10	4,52 ± 0,59	3,89 ± 0,47	3,31 ± 0,52	3,33 ± 0,23	2,75 ± 0,14	1,85 ± 0,26
50	3,24 ± 0,32	3,42 ± 0,88	2,11 ± 0,18	1,78 ± 0,07	1,97 ± 0,18	1,93 ± 0,16
100	1,87 ± 0,15	2,79 ± 0,79	1,97 ± 0,18	2,23 ± 0,30	1,64 ± 0,16	1,94 ± 0,17
500	2,16 ± 0,31	2,68 ± 0,39	2,31 ± 0,35	3,54 ± 1,15	3,68 ± 0,77	2,21 ± 0,19
<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>35,30 ± 13,52</b>	<b>9,64 ± 2,28</b>	<b>5,81 ± 0,37</b>	<b>11,35 ± 4,06</b>	<b>6,78 ± 0,72</b>	<b>3,88 ± 1,58</b>

NO<sub>2</sub>HTy: Nitrohidroxitirosol. NO<sub>2</sub>HTy-A: Acetato de nitrohidroxitirosilo. NO<sub>2</sub>HTy-E: Éter etílico de nitrohidroxitirosilo.  
 HTy: Hidroxitirosol. HTy-A: Acetato de hidroxitirosilo. HTy-E: Éter etílico de hidroxitirosilo.  
 FeAs: Sulfato ferroso + Ácido ascórbico (100 μM). IC<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria 50%.  
 TBARS: Productos de reacción con ácido tiobarbitúrico

En términos generales se observó una reducción de los valores de TBARS en los compuestos nitroderivados de HTy (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) aunque con valores de IC<sub>50</sub> superiores a los que presentaron los compuestos precursores (HTy, HTy-A y HTy-E). En la Figura 5.15 se representan gráficamente los valores de TBARS en una relación concentración-efecto tras la incubación con los compuestos. Así, se muestran los valores de TBARS representados según las series de nitrocatecoles (arriba) o catecoles (abajo).



**Figura 5.15**

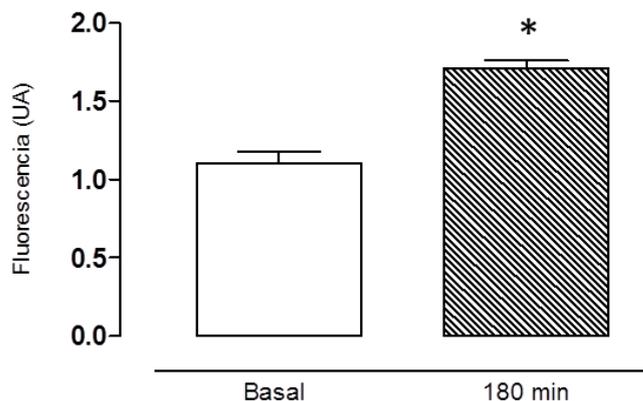
Curva concentración-efecto de los nitrocatecoles (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) (izquierda) y catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E) (derecha) en términos de porcentajes de cambio respecto al tejido inducido (100% de producción de TBARS)

A la vista de los resultados, cabe destacar que ambos derivados lipofílicos de nitrohidroxitirosilo (NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) mostraron una significativa reducción de la peroxidación lipídica en comparación con NO<sub>2</sub>HTy aunque este efecto fue mayor para los derivados lipofílicos de hidroxitirosol (HTy-A y HTy-E) logrando una mayor potencia antiperoxidativa con valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 10 µM.

#### 5.4.1.1.1.2. Determinación del contenido intracelular de radicales libres

Se llevó a cabo la determinación del contenido intracelular de EROs espectrofluorométricamente a través de la inducción química del tejido con *t*-BOOH. Los valores de fluorescencia mostraron un aumento significativo en el tejido sometido a la inducción química con *t*-BOOH respecto al tejido no inducido (Figura 5.16).

## 5. Resultados



\*p < 0,003 respecto al valor basal

**Figura 5.16**

Cuantificación de la fluorescencia como medida del contenido intracelular de EROs en el tejido sometido a la inducción química con *t*-BOOH respecto al tejido no inducido

En la siguiente tabla de datos (Tabla 5.9) se muestran los resultados (media  $\pm$  EEM) correspondientes a los valores de fluorescencia como parámetro de medida del contenido intracelular de EROs en el proceso de inducción con *t*-BOOH descrito anteriormente.

**Tabla 5.9**

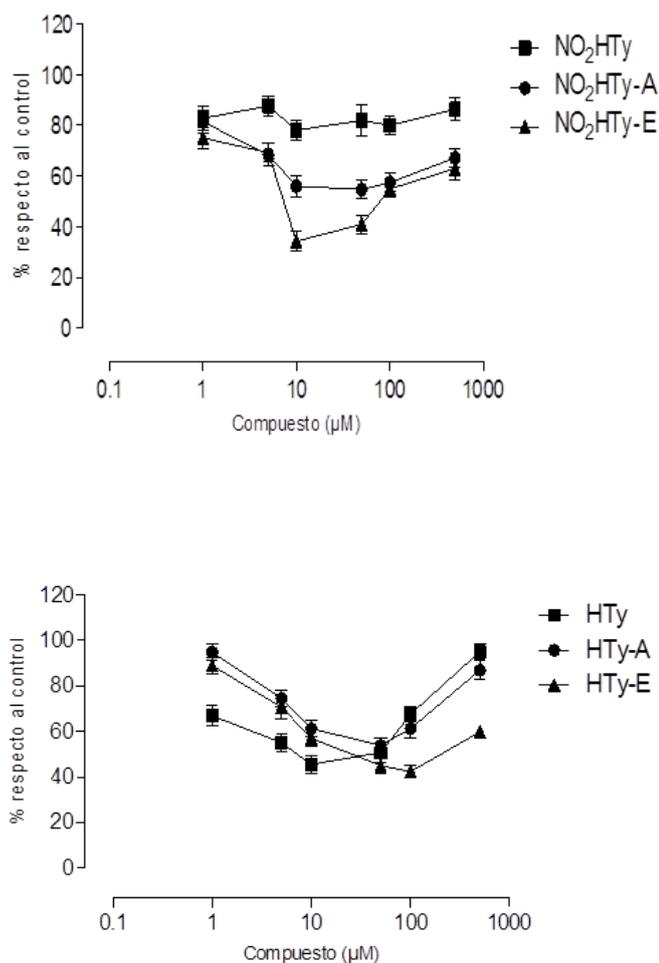
Valores (media  $\pm$  EEM) de EROs (fluorescencia UA/100 mg tejido) en tejido cerebral inducido químicamente con *t*-BOOH, tras la incubación con diferentes concentraciones de los derivados nitrocatecoles (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E)

Concentración ( $\mu$ M)	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E	HTy	HTy-A	HTy-E
<b>0</b>	2,25 $\pm$ 0,01	4,12 $\pm$ 0,02	4,19 $\pm$ 0,15	5,30 $\pm$ 0,16	2,44 $\pm$ 0,11	5,43 $\pm$ 0,13
<b>0 + <i>t</i>-BOOH</b>	11,56 $\pm$ 0,66	18,29 $\pm$ 1,59	18,51 $\pm$ 1,87	25,52 $\pm$ 1,82	14,92 $\pm$ 1,67	21,32 $\pm$ 1,66
<b>1</b>	9,57 $\pm$ 0,78	14,88 $\pm$ 1,57	13,89 $\pm$ 1,17	17,08 $\pm$ 1,36	14,15 $\pm$ 1,82	18,96 $\pm$ 1,76
<b>5</b>	10,14 $\pm$ 0,75	12,52 $\pm$ 1,48	12,83 $\pm$ 1,80	14,04 $\pm$ 0,66	11,12 $\pm$ 2,58	15,07 $\pm$ 1,01
<b>10</b>	9,03 $\pm$ 0,80	10,26 $\pm$ 1,14	6,35 $\pm$ 0,80	11,62 $\pm$ 1,00	9,15 $\pm$ 1,45	12,15 $\pm$ 1,70
<b>50</b>	9,37 $\pm$ 0,96	10,00 $\pm$ 1,65	7,57 $\pm$ 0,65	12,97 $\pm$ 2,29	8,05 $\pm$ 1,23	9,61 $\pm$ 0,85
<b>100</b>	9,26 $\pm$ 0,85	10,52 $\pm$ 1,63	10,17 $\pm$ 2,98	17,25 $\pm$ 3,16	9,15 $\pm$ 1,00	9,04 $\pm$ 0,69
<b>500</b>	9,99 $\pm$ 0,75	12,29 $\pm$ 1,59	11,64 $\pm$ 2,30	24,27 $\pm$ 2,36	12,97 $\pm$ 1,20	12,75 $\pm$ 1,02
<b>IC<sub>50</sub> (<math>\mu</math>M)</b>	<b>&gt; 500</b>	<b>12,90 <math>\pm</math> 5,14</b>	<b>8,67 <math>\pm</math> 0,49</b>	<b>8,92 <math>\pm</math> 2,88</b>	<b>9,71 <math>\pm</math> 3,61</b>	<b>13,83 <math>\pm</math> 6,66</b>

NO<sub>2</sub>HTy: Nitrohidroxitirosol. NO<sub>2</sub>HTy-A: Acetato de nitrohidroxitirosilo. NO<sub>2</sub>HTy-E: Éter efílico de nitrohidroxitirosilo. HTy: Hidroxitirosol. HTy-A: Acetato de hidroxitirosilo. HTy-E: Éter efílico de hidroxitirosilo. IC<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria 50%. *t*-BOOH: *tert*-butilhidroxiperóxido. EROs: Especies reactivas de oxígeno

El análisis del efecto antioxidante de los compuestos representados según las series de nitrocatecoles y catecoles, se observó una fuerte caída de los valores de fluorescencia en las muestras de tejido que fueron incubadas principalmente con los derivados lipofílicos de ambas series de compuestos

(Figura 5.17), con una  $IC_{50}$  de 12,90 y 8,67  $\mu\text{M}$  para  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$  y  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ , respectivamente y 9,71 y 13,83  $\mu\text{M}$  para  $\text{HTy-A}$  y  $\text{HTy-E}$ , respectivamente (Ver tabla 5.9). Respecto a los precursores de ambas series, cabe destacar el alto valor de  $IC_{50}$  para el  $\text{NO}_2\text{HTy}$ , superior a 500  $\mu\text{M}$ , a diferencia de su análogo  $\text{HTy}$  con un valor de  $IC_{50}$  en torno a 9  $\mu\text{M}$  (Figura 5.17, tabla 5.9).

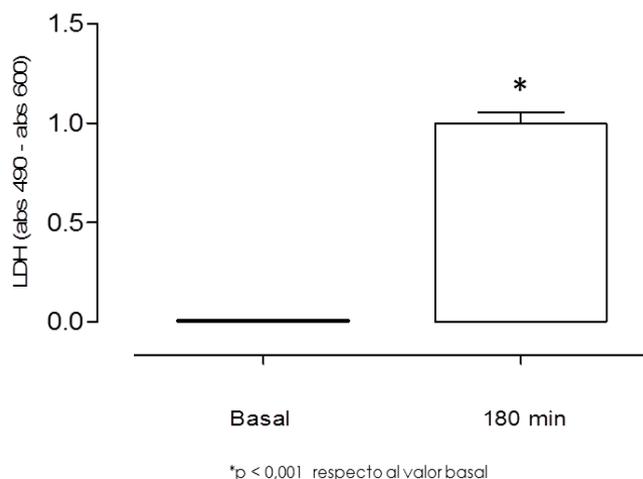


**Figura 5.17**

Curva concentración-efecto de los nitrocatecoles ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ ,  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$  y  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ ) (arriba) y catecoles ( $\text{HTy}$ ,  $\text{HTy-A}$  y  $\text{HTy-E}$ ) (abajo) en términos de porcentajes de cambio respecto al tejido inducido (100% de producción de fluorescencia)

Asimismo, a fin de cuantificar el daño, se obtuvieron valores de lactato deshidrogenasa (LDH) como medida indirecta de muerte celular. El tejido cerebral tras la inducción química durante 180 minutos con *t*-BOOH permitió cuantificar valores de muerte celular respecto al tejido sin inducir (Figura 5.18).

## 5. Resultados



**Figura 5.18**

Cuantificación de LDH en tejido sometido a inducción química con *t*-BOOH respecto a tejido no inducido

En la Tabla 5.10 se muestran los resultados (media  $\pm$  EEM) correspondientes a los valores de LDH en tejido cerebral sometido a inducción química con *t*-BOOH (100  $\mu$ M) e incubación con los diferentes compuestos fenólicos, nitroderivados (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y sus precursores (HTy, HTy-A y HTy-E), en un rango de concentraciones creciente (1-500  $\mu$ M).

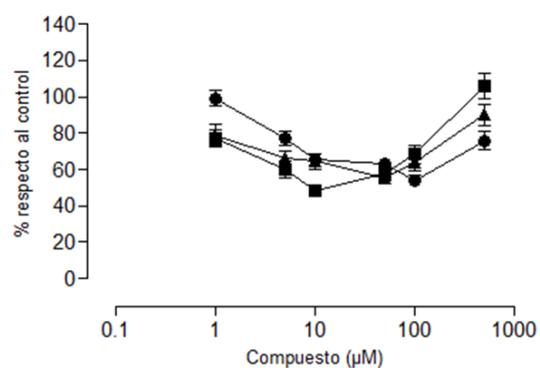
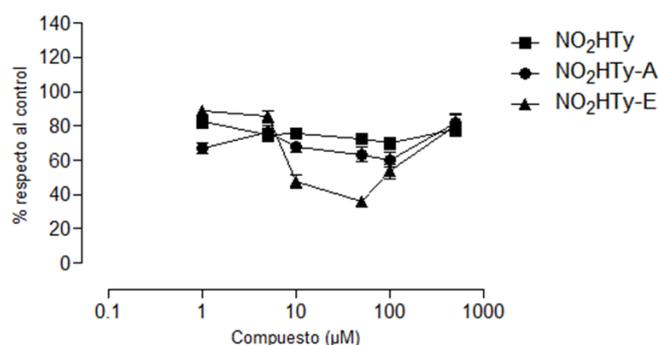
**Tabla 5.10**

Valores (media  $\pm$  EEM) de LDH (UA/mg tejido) muestras de tejido cerebral inducido químicamente con *t*-BOOH, tras la incubación con diferentes concentraciones de los derivados nitrocateoles (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E)

Concentración ( $\mu$ M)	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E	HTy	HTy-A	HTy-E
0	0,25 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,02
0 + <i>t</i> -BOOH	1,19 $\pm$ 0,07	1,26 $\pm$ 0,05	1,16 $\pm$ 0,20	1,20 $\pm$ 0,12	1,23 $\pm$ 0,09	1,21 $\pm$ 0,09
1	0,98 $\pm$ 0,05	0,84 $\pm$ 0,09	1,03 $\pm$ 0,20	0,93 $\pm$ 0,10	1,22 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,07
5	0,89 $\pm$ 0,11	0,96 $\pm$ 0,09	0,99 $\pm$ 0,19	0,72 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,07	0,80 $\pm$ 0,03
10	0,90 $\pm$ 0,05	0,85 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,10	0,58 $\pm$ 0,06	0,81 $\pm$ 0,08	0,78 $\pm$ 0,06
50	0,86 $\pm$ 0,07	0,80 $\pm$ 0,08	0,42 $\pm$ 0,90	0,69 $\pm$ 0,07	0,78 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,05
100	0,83 $\pm$ 0,13	0,76 $\pm$ 0,09	0,62 $\pm$ 0,12	0,82 $\pm$ 0,10	0,66 $\pm$ 0,06	0,77 $\pm$ 0,07
500	0,93 $\pm$ 0,18	1,03 $\pm$ 0,13	0,93 $\pm$ 0,17	1,27 $\pm$ 0,11	0,93 $\pm$ 0,06	1,09 $\pm$ 0,05
IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	> 500	> 500	9,99 $\pm$ 1,26	12,86 $\pm$ 1,02	> 500	> 500

NO<sub>2</sub>HTy: Nitrohidroxitirosol. NO<sub>2</sub>HTy-A: Acetato de nitrohidroxitirosilo. NO<sub>2</sub>HTy-E: Éter etílico de nitrohidroxitirosilo. HTy: Hidroxitirosol. HTy-A: Acetato de hidroxitirosilo. HTy-E: Éter etílico de hidroxitirosilo. IC<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria 50%. *t*-BOOH: *tert*-butilhidroxiperóxido

Los resultados vislumbraron una disminución máxima de los valores de muerte celular a una concentración en torno a 50–100  $\mu\text{M}$  para casi todos los compuestos fenólicos estudiados, con una  $\text{IC}_{50}$  superior a la máxima concentración ensayada de 500  $\mu\text{M}$ , a excepción de los compuestos  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$  y  $\text{HTy}$ , que mostraron una actividad neuroprotectora mayor con valores de  $\text{IC}_{50}$  en torno a 10  $\mu\text{M}$ . (Ver Tabla 5.10). En un análisis global, cabe destacar que el  $\text{HTy}$  mostró el mejor perfil neuroprotector de todos los compuestos ensayados, seguido de  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$  (Figura 5.19).



**Figura 5.19**

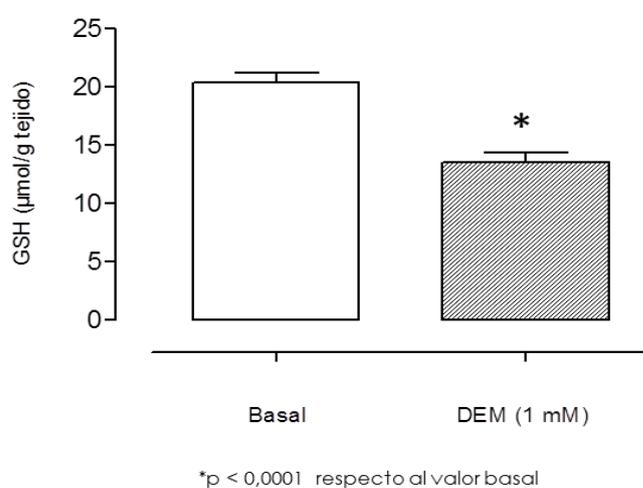
Curva concentración-efecto de los nitrocatecoles ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ ,  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$  y  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ ) (Figura arriba) y catecoles ( $\text{HTy}$ ,  $\text{HTy-A}$  y  $\text{HTy-E}$ ) (Figura abajo) en términos de porcentajes de cambio respecto al tejido inducido (100% de producción de LDH)

## 5. Resultados

### 5.4.1.1.1.3. Determinación del sistema de defensa antioxidante Glutación

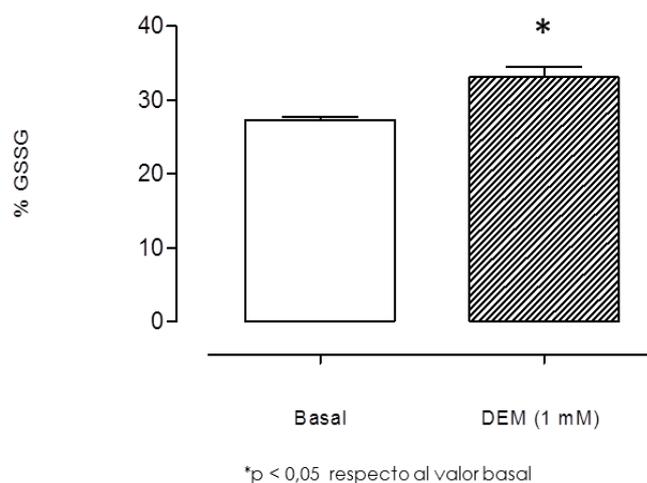
La capacidad de defensa antioxidante se cuantificó a través de los niveles de GSH y GSSG tras la incubación con DEM, sustancia que reduce los depósitos de GSH.

Los valores de GSH disminuyeron significativamente en el tejido sometido a la inducción química respecto al tejido sin inducir siendo este comportamiento contrario para los valores de GSSG expresados en porcentaje respecto a glutación total (Figuras 5.20 y 5.21, respectivamente).



**Figura 5.20**

Cuantificación de glutación reducido (GSH) en tejido sometido a inducción química con maleato de dietilo (DEM) respecto al tejido no inducido



**Figura 5.21**

Cuantificación del porcentaje de glutación oxidado (GSSG) respecto a glutación total (GSH-GSSG) en tejido sometido a inducción química con maleato de dietilo (DEM) en comparación con el tejido no inducido

En estas condiciones, el tejido fue incubado en concentraciones crecientes de los diferentes compuestos fenólicos, obteniéndose los siguientes resultados que muestran los valores de GSH (Tabla 5.11) y valores de %GSSG respecto a GSH+GSSG (Tabla 5.12), en tejido cerebral sometido a inducción química con *t*-BOOH (100  $\mu$ M) e incubación con ambas series de nitrocatecoles (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E), en un rango de concentraciones creciente (1–500  $\mu$ M).

**Tabla 5.11**

Valores (media  $\pm$  EEM) de **GSH** ( $\mu$ mol/g tejido) en muestras de tejido cerebral inducido químicamente con DEM, tras la incubación con diferentes concentraciones de los derivados nitrocatecoles (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E)

Concentración ( $\mu$ M)	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E	HTy	HTy-A	HTy-E
<b>0</b>	22,65 $\pm$ 1,76	22,65 $\pm$ 1,76	22,65 $\pm$ 1,76	14,64 $\pm$ 1,58	14,64 $\pm$ 1,58	14,64 $\pm$ 1,58
<b>0 + DEM</b>	13,75 $\pm$ 1,27	12,29 $\pm$ 0,82	14,34 $\pm$ 0,85	5,78 $\pm$ 0,40	5,78 $\pm$ 0,40	5,78 $\pm$ 0,40
<b>0,1</b>	15,55 $\pm$ 1,27	13,26 $\pm$ 0,80	13,98 $\pm$ 1,16	6,50 $\pm$ 0,28	7,66 $\pm$ 0,42	7,20 $\pm$ 0,27
<b>1</b>	13,42 $\pm$ 1,50	12,97 $\pm$ 0,57	12,43 $\pm$ 0,93	6,26 $\pm$ 0,22	6,38 $\pm$ 0,90	9,95 $\pm$ 0,49
<b>10</b>	12,01 $\pm$ 0,77	12,84 $\pm$ 0,93	12,14 $\pm$ 0,78	7,64 $\pm$ 0,30	7,13 $\pm$ 0,59	9,50 $\pm$ 1,09
<b>100</b>	14,68 $\pm$ 1,95	12,68 $\pm$ 0,67	11,65 $\pm$ 1,56	6,78 $\pm$ 0,33	6,28 $\pm$ 0,43	9,91 $\pm$ 0,83

NO<sub>2</sub>HTy: Nitrohidroxitirosol. NO<sub>2</sub>HTy-A: Acetato de nitrohidroxitirosilo. NO<sub>2</sub>HTy-E: Éter etílico de nitrohidroxitirosilo. HTy: Hidroxitirosol. HTy-A: Acetato de hidroxitirosilo. HTy-E: Éter etílico de hidroxitirosilo. DEM: Maleato de dietilo. GSH: Glutación reducido

**Tabla 5.12**

Valores (media  $\pm$  EEM) de **% GSSG** respecto a GSH+GSSG en muestras de tejido cerebral inducido químicamente con DEM, tras la incubación con diferentes concentraciones de los derivados nitrocatecoles (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E)

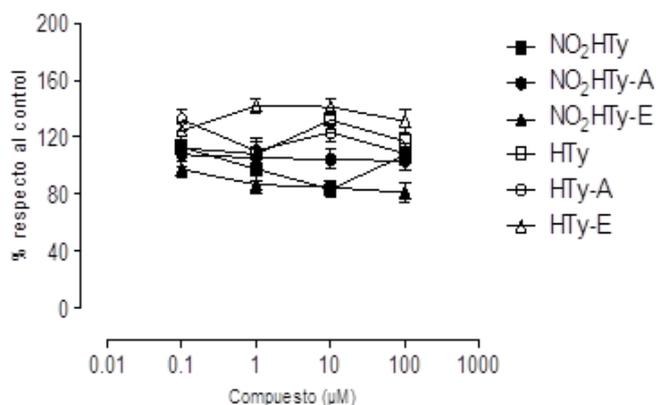
Concentración ( $\mu$ M)	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E	HTy	HTy-A	HTy-E
<b>0</b>	28,33 $\pm$ 1,55	28,33 $\pm$ 1,55	28,89 $\pm$ 3,69	28,99 $\pm$ 2,23	28,99 $\pm$ 2,23	28,99 $\pm$ 2,23
<b>0 + DEM</b>	32,86 $\pm$ 2,11	32,86 $\pm$ 2,11	32,86 $\pm$ 2,11	37,31 $\pm$ 1,70	37,30 $\pm$ 1,70	37,30 $\pm$ 1,70
<b>0,1</b>	33,37 $\pm$ 1,17	29,73 $\pm$ 1,55	34,18 $\pm$ 2,31	35,20 $\pm$ 1,11	37,30 $\pm$ 1,70	37,30 $\pm$ 1,70
<b>1</b>	35,70 $\pm$ 2,08	30,33 $\pm$ 2,18	39,52 $\pm$ 3,36	31,64 $\pm$ 0,67	34,76 $\pm$ 5,48	30,77 $\pm$ 3,38
<b>10</b>	41,74 $\pm$ 9,81	33,11 $\pm$ 1,91	42,48 $\pm$ 2,09	31,16 $\pm$ 0,59	28,41 $\pm$ 1,51	32,37 $\pm$ 2,56
<b>100</b>	35,54 $\pm$ 1,58	30,80 $\pm$ 2,97	36,50 $\pm$ 3,58	31,22 $\pm$ 0,86	31,86 $\pm$ 1,25	32,84 $\pm$ 2,13

NO<sub>2</sub>HTy: Nitrohidroxitirosol. NO<sub>2</sub>HTy-A: Acetato de nitrohidroxitirosilo. NO<sub>2</sub>HTy-E: Éter etílico de nitrohidroxitirosilo. HTy: Hidroxitirosol. HTy-A: Acetato de hidroxitirosilo. HTy-E: Éter etílico de hidroxitirosilo. DEM: Maleato de dietilo. GSSG: Glutación oxidado

Los resultados no mostraron diferencias significativas en los niveles de GSH (Figura 5.22) y GSSG (Figura 5.23) tras la incubación con las diferentes

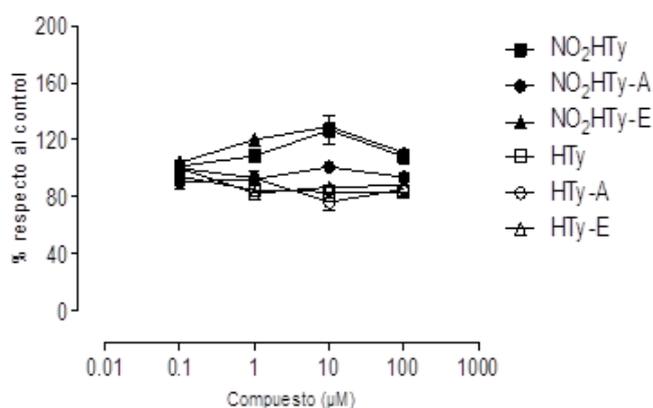
## 5. Resultados

concentraciones de los compuestos fenólicos respecto a las muestras controles inducidas con DEM, a excepción del derivado lipofílico HTy-E cuya incubación con el tejido manifestó una ligera recuperación de los niveles de GSH.



**Figura 5.22**

Curva concentración-efecto de los compuestos fenólicos (serie nitrocatecol y catecol) en términos de porcentajes de cambio respecto al tejido inducido (100% de GSH)



**Figura 5.23**

Curva concentración-efecto de los compuestos fenólicos (serie nitrocatecol y catecol) en términos de porcentajes de cambio respecto al tejido inducido (100% de GSSG)

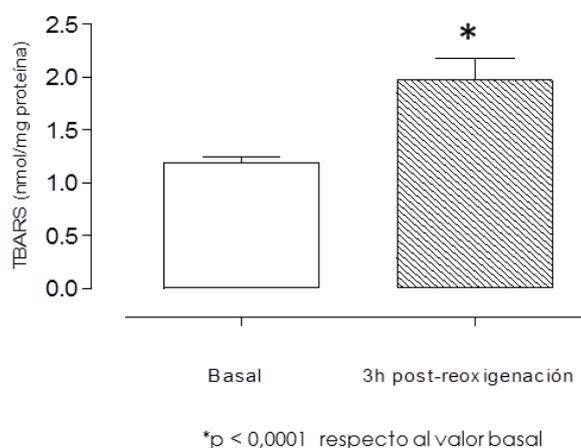
### 5.4.1.2. Resultados de las variables del tejido cerebral sometido a hipoxia-reoxigenación

#### 5.4.1.2.1. Variables de estrés oxidativo

##### 5.4.1.2.1.1. Determinación de productos de la peroxidación lipídica (MDA)

La capacidad antiperoxidativa fue determinada tras la inducción del daño oxidativo a través del modelo experimental HR. Los valores de TBARS aumentaron significativamente en el tejido sometido a la inducción química

respecto al tejido sin inducción transcurrido el periodo último de reoxigenación del proceso (Figura 5.24).



**Figura 5.24**

Cuantificación de los TBARS en tejido sometido a hipoxia- reoxigenación (HR) respecto a valores basales

En la siguiente tabla de datos (Tabla 5.13) se muestran los resultados medios (media  $\pm$  EEM) correspondientes a los valores de TBARS, como índice de producción de peróxidos lipídicos, en tejido cerebral sometido al modelo experimental HR y simultánea incubación con los diferentes compuestos fenólicos, nitroderivados (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y sus precursores (HTy, HTy-A y HTy-E).

**Tabla 5.13**

Valores (media  $\pm$  EEM) de **TBARS** ( $\mu$ mol/mg proteína) en muestras de tejido cerebral sometidas al proceso de HR, tras la incubación con diferentes concentraciones de los derivados nitrocatecoles (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E)

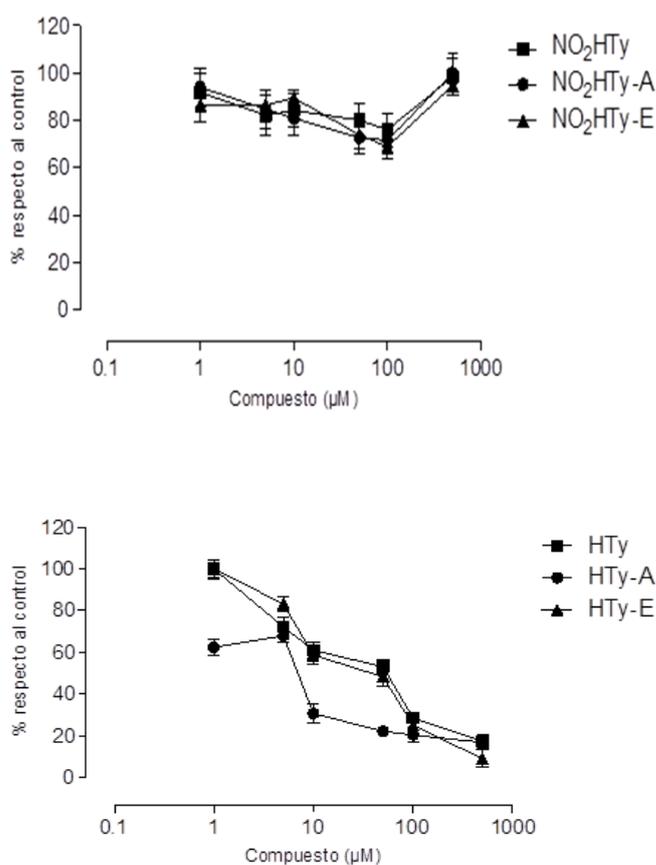
Concentración ( $\mu$ M)	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E	HTy	HTy-A	HTy-E
<b>0</b>	1,19 $\pm$ 0,01	1,19 $\pm$ 0,01	1,19 $\pm$ 0,01	3,05 $\pm$ 0,13	3,18 $\pm$ 0,20	3,18 $\pm$ 0,20
<b>0 + HR</b>	11,97 $\pm$ 0,04	11,97 $\pm$ 0,04	11,97 $\pm$ 0,04	13,06 $\pm$ 1,13	13,06 $\pm$ 1,13	13,06 $\pm$ 1,13
<b>1</b>	11,81 $\pm$ 0,07	11,73 $\pm$ 0,06	11,67 $\pm$ 0,11	15,72 $\pm$ 1,63	8,15 $\pm$ 0,81	13,96 $\pm$ 0,20
<b>5</b>	11,62 $\pm$ 0,18	11,56 $\pm$ 0,07	11,67 $\pm$ 0,01	9,42 $\pm$ 0,95	8,87 $\pm$ 1,08	10,86 $\pm$ 0,21
<b>10</b>	11,66 $\pm$ 0,04	10,49 $\pm$ 0,08	10,73 $\pm$ 0,18	7,98 $\pm$ 0,73	4,01 $\pm$ 0,45	7,67 $\pm$ 0,20
<b>50</b>	11,58 $\pm$ 0,07	11,34 $\pm$ 0,05	11,43 $\pm$ 0,12	6,93 $\pm$ 0,42	2,95 $\pm$ 0,34	6,30 $\pm$ 0,18
<b>100</b>	11,50 $\pm$ 0,06	11,32 $\pm$ 0,04	10,33 $\pm$ 0,14	3,72 $\pm$ 0,39	2,67 $\pm$ 0,35	3,27 $\pm$ 0,03
<b>500</b>	10,94 $\pm$ 0,04	10,91 $\pm$ 0,03	10,83 $\pm$ 0,10	2,27 $\pm$ 0,30	2,20 $\pm$ 0,31	1,19 $\pm$ 0,03
<b>IC<sub>50</sub> (<math>\mu</math>M)</b>	<b>&gt; 500</b>	<b>&gt; 500</b>	<b>&gt; 500</b>	<b>52,41 <math>\pm</math> 5,60</b>	<b>6,60 <math>\pm</math> 0,58</b>	<b>76,03 <math>\pm</math> 2,38</b>

NO<sub>2</sub>HTy: Nitrohidroxitirosol. NO<sub>2</sub>HTy-A: Acetato de nitrohidroxitirosilo. NO<sub>2</sub>HTy-E: Éter etílico de nitrohidroxitirosilo. HTy: Hidroxitirosol. HTy-A: Acetato de hidroxitirosilo. HTy-E: Éter etílico de hidroxitirosilo. HR: Hipoxia-reoxigenación. IC<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria 50%. TBARS: Productos de reacción con ácido tiobarbitúrico.

## 5. Resultados

Tras el análisis de los resultados se observó cómo los compuestos nitrocatecoles no mostraron una capacidad antiperoxidativa significativa tras el proceso HR, a diferencia de la serie de compuestos catecoles con valores de IC<sub>50</sub> de 52,41, 6,60 y 76,03  $\mu\text{M}$  para HTy, HTy-A y HTy-E, respectivamente.

Este hecho evidencia una falta de potencia antiperoxidativa tras la inducción del daño por HR en los compuestos nitroderivados, contrario a la actividad antioxidante manifestada por la serie catecol (Figura 5.25).



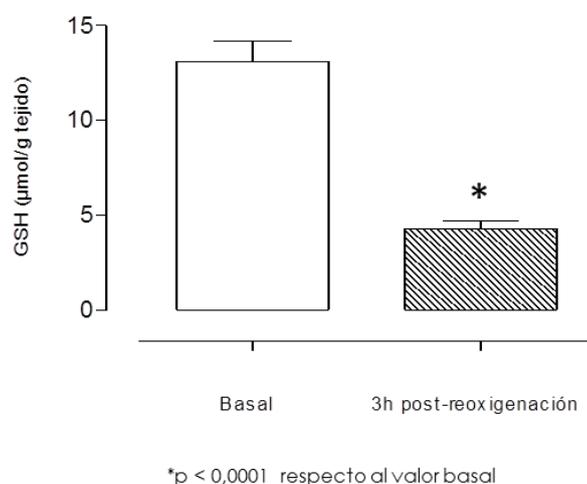
**Figura 5.25**

Curva concentración-efecto de los nitrocatecoles (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) (arriba) y los catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E) (abajo) en términos de porcentajes de cambio respecto al tejido inducido (100% de producción de TBARS)

### 5.4.1.2.1.2. Determinación del sistema de defensa antioxidante Glutati6n

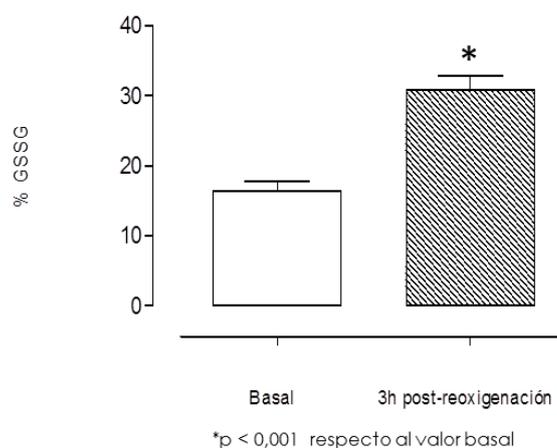
Se determin6 la capacidad de defensa antioxidante a trav6s de la cuantificaci6n de los niveles de GSH y GSSG tras el modelo experimental HR, observ6ndose una disminuci6n significativa en los niveles de GSH as6 como un

incremento en el porcentaje en su forma oxidada (GSSG) (Figuras 5.26 y 5.27, respectivamente).



**Figura 5.26**

Cuantificación GSH en tejido sometido al proceso experimental de HR respecto a valores basales



**Figura 5.27**

Cuantificación del porcentaje de GSSG respecto a glutatión total en tejido sometido al proceso experimental de HR respecto a valores basales

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, han puesto de manifiesto que sólo la concentración de 100 µM modifica la reducción y aumento de GSH y GSSG respectivamente, en el modelo de HR. Por ello, se procedió a la incubación con la concentración mencionada de los distintos compuestos utilizados en el presente estudio.

En las siguientes tablas de datos se muestran los resultados (media ± EEM) correspondientes a los valores de GSH (Tabla 5.14) y GSSG (Tabla 5.15) tras el

## 5. Resultados

proceso de HR y simultánea incubación con 100  $\mu\text{M}$  de los compuestos de ambas series de catecoles y nitrocatecoles.

**Tabla 5.14**

Valores (media  $\pm$  EEM) de **GSH** ( $\mu\text{mol/g}$  tejido) en muestras de tejido cerebral tras el modelo experimental de HR e incubación con la concentración de 100  $\mu\text{M}$  de los derivados nitrocatecoles ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ ,  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$  y  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ ) y catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E)

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$\text{NO}_2\text{HTy}$	$\text{NO}_2\text{HTy-A}$	$\text{NO}_2\text{HTy-E}$	HTy	HTy-A	HTy-E
0	12,92 $\pm$ 0,69	12,92 $\pm$ 0,69	12,92 $\pm$ 0,69	13,01 $\pm$ 0,77	13,01 $\pm$ 0,77	13,01 $\pm$ 0,77
0 + HR	3,81 $\pm$ 0,62	3,81 $\pm$ 0,62	3,81 $\pm$ 0,62	4,75 $\pm$ 0,57	4,75 $\pm$ 0,57	4,75 $\pm$ 0,57
100	3,76 $\pm$ 0,43	3,15 $\pm$ 0,57	4,10 $\pm$ 0,34	7,55 $\pm$ 0,46	7,47 $\pm$ 0,32	7,58 $\pm$ 0,32

$\text{NO}_2\text{HTy}$ : Nitrohidroxitiroso.  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$ : Acetato de nitrohidroxitiroso.  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ : Éter etílico de nitrohidroxitiroso. HTy: Hidroxitiroso. HTy-A: Acetato de hidroxitiroso. HTy-E: Éter etílico de hidroxitiroso. HR: Hipoxia-reoxigenación. GSH: Glutación reducido

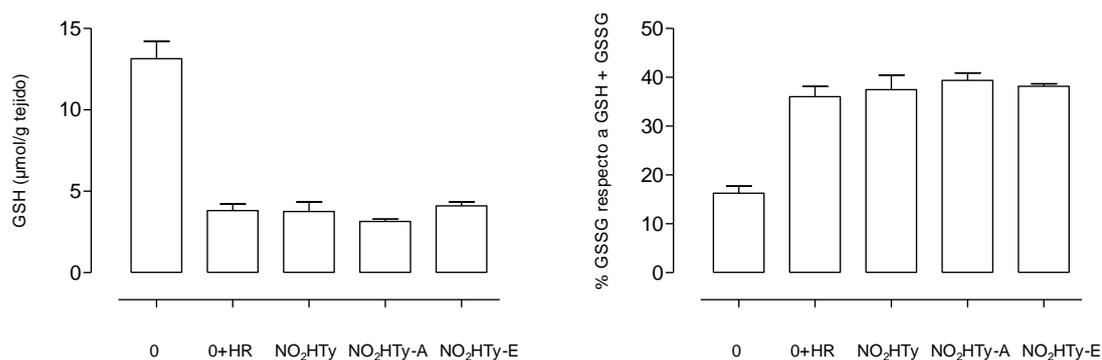
**Tabla 5.15**

Valores (media  $\pm$  EEM) % **GSSG** respecto a GSH+GSSG en muestras de tejido cerebral tras el modelo experimental de HR e incubación con la concentración de 100  $\mu\text{M}$  de los derivados nitrocatecoles ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ ,  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$  y  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ ) y catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E)

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$\text{NO}_2\text{HTy}$	$\text{NO}_2\text{HTy-A}$	$\text{NO}_2\text{HTy-E}$	HTy	HTy-A	HTy-E
0	16,63 $\pm$ 0,84	16,63 $\pm$ 0,84	16,63 $\pm$ 0,84	16,06 $\pm$ 1,06	16,06 $\pm$ 1,06	16,06 $\pm$ 1,06
0 + HR	36,06 $\pm$ 2,22	36,06 $\pm$ 2,22	36,06 $\pm$ 2,22	25,66 $\pm$ 2,27	25,66 $\pm$ 2,27	25,66 $\pm$ 2,27
100	37,47 $\pm$ 1,65	39,38 $\pm$ 1,05	38,17 $\pm$ 3,06	17,59 $\pm$ 1,07	18,43 $\pm$ 1,49	16,87 $\pm$ 0,84

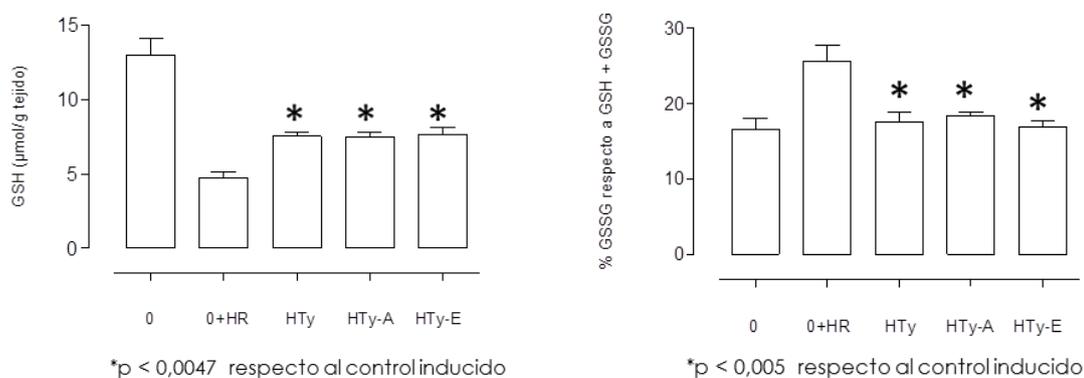
$\text{NO}_2\text{HTy}$ : Nitrohidroxitiroso.  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$ : Acetato de nitrohidroxitiroso.  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ : Éter etílico de nitrohidroxitiroso. HTy: Hidroxitiroso. HTy-A: Acetato de hidroxitiroso. HTy-E: Éter etílico de hidroxitiroso. HR: Hipoxia-reoxigenación. GSSG: Glutación oxidado

A continuación se muestra un análisis comparativo de los compuestos nitrocatecoles (Figura 5.28) y los catecoles (Figura 5.29) de la actividad de defensa antioxidante del sistema glutación. Se pudo comprobar que los compuestos nitroderivados de HTy no mostraron diferencias significativas para ambas determinaciones. Por el contrario, la actividad de glutación en su forma reducida y oxidada sí se vio modificada tras la incubación con los compuestos precursores, en particular para la forma oxidada (GSSH), que recuperó los niveles basales.



**Figura 5.28**

Cuantificación de los valores de glutatión reducido (GSH) (Figura izquierda) y oxidado (GSSG, expresado en porcentaje respecto a glutatión total) (Figura derecha) en el tejido sometido al modelo experimental de hipoxia-reoxigenación e incubado con los compuestos nitrocatecoles ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ ,  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$ ,  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ ) a concentración de  $100 \mu\text{M}$



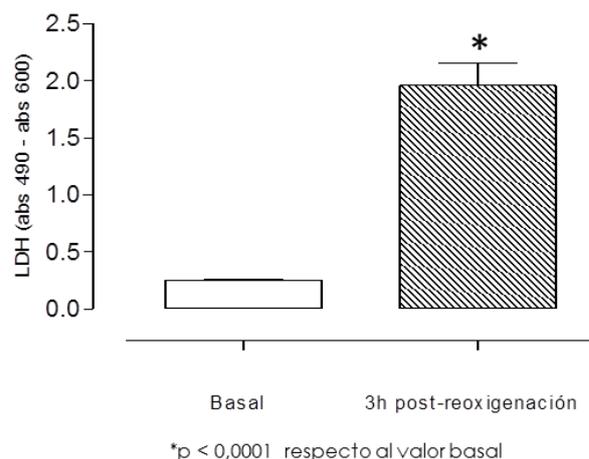
**Figura 5.29**

Cuantificación de los valores de glutatión reducido (GSH) (Figura izquierda) y oxidado (GSSG, expresado en porcentaje respecto a glutatión total) (Figura derecha) en el tejido sometido al modelo experimental de hipoxia-reoxigenación e incubado con los compuestos catecoles (HTy, HTy-A, HTy-E) a concentración de  $100 \mu\text{M}$

#### 5.4.1.2.1.3. Variables de muerte celular

Los valores de muerte celular en el tejido sometido a un proceso de hipoxia-reoxigenación mostraron un aumento significativo respecto a valores basales (Figura 5.30).

## 5. Resultados



**Figura 5.30**

Cuantificación de lactato deshidrogenasa (LDH) en tejido sometido a HR respecto a valores basales

En la Tabla 5.16 se muestran los resultados medios (media  $\pm$  EEM) correspondientes a los valores de LDH, como índice de muerte celular, en tejido cerebral sometido a un modelo de HR e incubación con los diferentes compuestos fenólicos, nitroderivados (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y sus precursores (HTy, HTy-A y HTy-E), en un rango de concentraciones creciente (1-500  $\mu$ M).

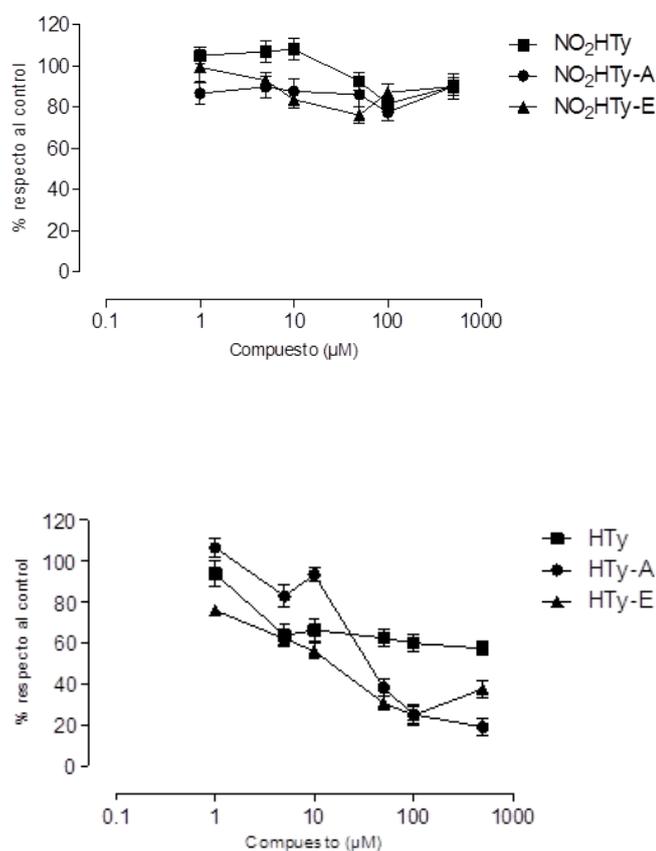
**Tabla 5.16**

Valores (media  $\pm$  EEM) de **LDH** (UA/mg tejido) en muestras de tejido cerebral tras el modelo experimental HR e incubación con diferentes concentraciones de los derivados nitrocatecoles (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E)

Concentración ( $\mu$ M)	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E	HTy	HTy-A	HTy-E
<b>0</b>	0,25 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,04
<b>0 + HR</b>	1,96 $\pm$ 0,04	1,96 $\pm$ 0,04	1,96 $\pm$ 0,04	3,13 $\pm$ 0,10	3,13 $\pm$ 0,10	3,13 $\pm$ 0,10
<b>1</b>	1,67 $\pm$ 0,06	1,70 $\pm$ 0,09	1,71 $\pm$ 0,11	2,94 $\pm$ 0,41	3,34 $\pm$ 0,31	2,38 $\pm$ 0,09
<b>5</b>	1,70 $\pm$ 0,20	1,76 $\pm$ 0,13	1,60 $\pm$ 0,08	2,00 $\pm$ 0,16	2,60 $\pm$ 0,48	1,95 $\pm$ 0,13
<b>10</b>	1,72 $\pm$ 0,14	1,72 $\pm$ 0,08	1,44 $\pm$ 0,08	2,08 $\pm$ 0,08	2,93 $\pm$ 0,57	1,76 $\pm$ 0,10
<b>50</b>	1,47 $\pm$ 0,13	1,69 $\pm$ 0,19	1,31 $\pm$ 0,05	1,96 $\pm$ 0,25	1,20 $\pm$ 0,21	0,97 $\pm$ 0,12
<b>100</b>	1,30 $\pm$ 0,13	1,52 $\pm$ 0,17	1,50 $\pm$ 0,10	1,88 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,12	0,78 $\pm$ 0,03
<b>500</b>	2,80 $\pm$ 0,17	2,78 $\pm$ 0,21	1,98 $\pm$ 0,18	1,80 $\pm$ 0,17	0,60 $\pm$ 0,21	1,18 $\pm$ 0,14
<b>IC<sub>50</sub> (<math>\mu</math>M)</b>	<b>&gt; 500</b>	<b>&gt; 500</b>	<b>&gt; 500</b>	<b>165,00 <math>\pm</math> 2,80</b>	<b>13,36 <math>\pm</math> 1,25</b>	<b>28,10 <math>\pm</math> 2,89</b>

NO<sub>2</sub>HTy: Nitrohidroxitirosol. NO<sub>2</sub>HTy-A: Acetato de nitrohidroxitirosilo. NO<sub>2</sub>HTy-E: Éter etílico de nitrohidroxitirosilo.  
HTy: Hidroxitirosol. HTy-A: Acetato de hidroxitirosilo. HTy-E: Éter etílico de hidroxitirosilo. HR: Hipoxia-reoxigenación. LDH: Lactato deshidrogenasa

Los compuestos nitroderivados de HTy redujeron parcialmente la muerte celular inducida por el modelo HR (Ver Tabla 5.16), como se desprende de los altos valores obtenidos para el parámetro  $IC_{50}$ , superior a la máxima concentración evaluada de 500  $\mu\text{M}$ . Los compuestos  $\text{NO}_2\text{HTy}$  y  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$  ofrecieron su mayor actividad a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  mientras que  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$  resultó comparativamente ser más activo al reducir el daño significativamente con 50  $\mu\text{M}$  (Figura 5.31). Por otro lado, la serie catecol mostró mayor actividad que la serie nitrocatecol, con valores de  $IC_{50}$  significativamente más pequeños, en particular para los compuestos más lipofílicos, 13,36 y 28,10  $\mu\text{M}$  para HTy-A y HTy-E, respectivamente.



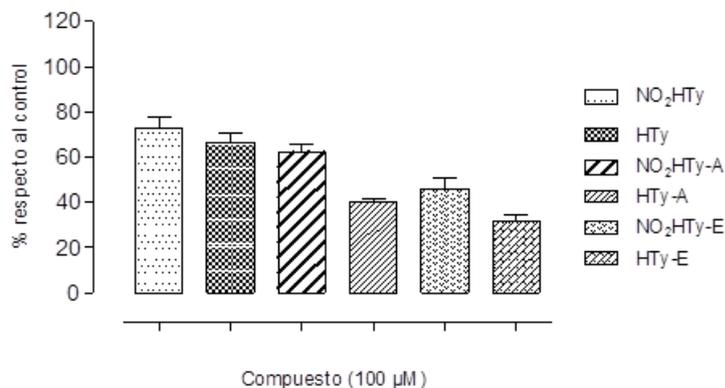
**Figura 5.31**

Curva concentración-efecto de los nitrocatecoles ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ ,  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$  y  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ ) (arriba) y catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E) (abajo) en términos de porcentajes de cambio respecto al tejido inducido (100% de LDH)

Asimismo y considerando una única concentración (100  $\mu\text{M}$ ), se llevó a cabo un estudio comparativo de los compuestos nitrados y sus precursores (Figura 5.32) donde se pudo comprobar cómo los derivados lipofílicos ofrecían un mejor perfil neuroprotector que sus respectivos precursores en ambas series,

## 5. Resultados

nitrocatecol y catecol. Cabe citar también que los derivados alquílicos HTy-E y NO<sub>2</sub>HTy-E produjeron el máximo efecto de neuroprotección tras el modelo experimental HR.



**Figura 5.32**

Cuantificación de los valores LDH expresado en términos de porcentajes respecto las muestras controles (100% de producción de LDH). Análisis comparativo de los compuestos nitroderivados (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A, NO<sub>2</sub>HTy-E) y sus precursores (HTy, HTy-A, HTy-E) a concentración de 100 µM

### 5.4.2. Resultados correspondientes a los experimentos ex vivo

En la Tabla 5.17 se muestran los resultados medios (media ± EEM) correspondientes a los valores de TBARS y LDH, como índices de peroxidación lipídica y muerte celular, respectivamente. Se expresan los valores tras la administración oral durante 7 días de 20 mg/kg de los compuestos estudiados y posterior aplicación del modelo experimental HR en cortes cerebrales de ratas. Los valores de TBARS y LDH son expresados según el grupo experimental tras el tratamiento con el compuesto fenólico respecto a un valor control HR y un control absoluto sin tratamiento.

**Tabla 5.17**

Valores (media ± EEM) de **TBARS** (nmol/mg prot) y **LDH** (UA/mg tejido) en muestras de tejido cerebral tras el tratamiento oral (20 mg/kg/día) de los derivados nitrocatecoles (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) y catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E) y posterior desarrollo del modelo experimental HR

	Control	HR	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E	HTy	HTy-A	HTy-E
<b>TBARS</b>	3,64 ± 0,34	8,73 ± 0,53	8,47 ± 0,45	8,30 ± 0,32	8,12 ± 0,64	5,14 ± 0,50	3,65 ± 0,26	2,56 ± 0,14
<b>LDH</b>	0,12 ± 0,02	3,16 ± 0,10	3,79 ± 0,12	3,98 ± 0,16	3,01 ± 0,06	2,51 ± 0,08	2,11 ± 0,06	1,83 ± 0,02

NO<sub>2</sub>HTy: Nitrohidroxitirosol. NO<sub>2</sub>HTy-A: Acetato de nitrohidroxitirosilo. NO<sub>2</sub>HTy-E: Éter etílico de nitrohidroxitirosilo. HTy: Hidroxitirosol. HTy-A: Acetato de hidroxitirosilo. HTy-E: Éter etílico de hidroxitirosilo. HR: Hipoxia-reoxigenación. LDH: Lactato deshidrogenasa. TBARS: Productos de reacción con ácido tiobarbitúrico

Los nitroderivados de HTy no evitaron el daño inducido con el modelo HR al mostrar niveles de TBARS y LDH similares al control positivo, tejido cerebral sin tratar con los compuestos fenólicos. En cambio, la serie catecólica fue capaz de minimizar el estrés sometido al tejido cerebral, en particular los compuestos más lipofílicos, HTy-A y HTy-E.

## 5.5. Estudio del efecto de los nitroderivados de HTy sobre la actividad COMT

Con el fin de valorar el efecto neuroprotector de los nitrocatecoles seleccionados, nitrohidroxitirosilo (NO<sub>2</sub>HTy, **49**), acetato de nitrohidroxitirosilo (NO<sub>2</sub>HTy-A, **50**) y éter etílico de nitrohidroxitirosilo (NO<sub>2</sub>HTy-E, **59**) en la EP, se llevaron a cabo estudios *ex vivo* e *in vivo*. Todos estos estudios estuvieron encaminados a evaluar la potencia inhibidora de dichos compuestos sobre la actividad COMT a través del estudio de diferentes marcadores o metabolitos generados del catabolismo de la dopamina (DA). Asimismo, se emplearon con fines comparativos el compuesto de unidad catecol hidroxitirosol (HTy, **2**) así como el inhibidor comercial Ro 41-0960.

### 5.5.1. Estudio en tejido

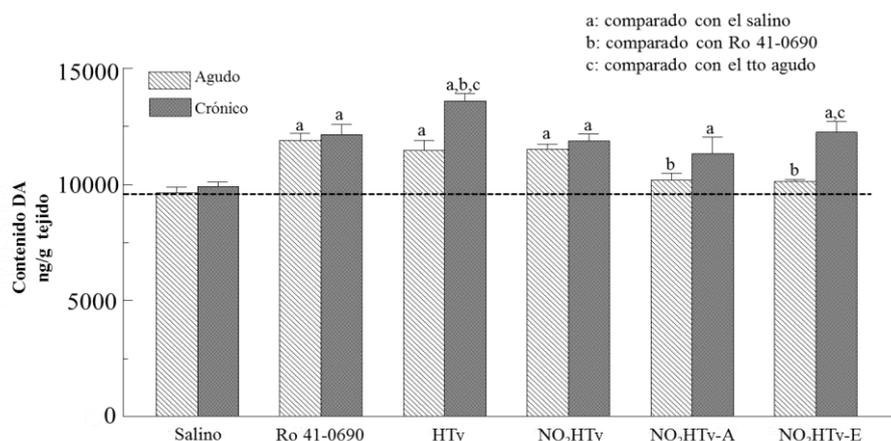
#### 5.5.1.1. Efecto sobre la DA y sus metabolitos

El tratamiento agudo, basado en una única administración intraperitoneal, mostró un claro y significativo incremento en el contenido de DA intracelular en el estriado para los compuestos Ro 41-0960, HTy y NO<sub>2</sub>HTy, en comparación con el control salino con aumentos de 123,6, 118,9 y 119,6%, respectivamente (Figura 5.33). Por el contrario, NO<sub>2</sub>HTy-A (105,8%) y NO<sub>2</sub>HTy-E (104,8%) no mostraron diferencias significativas respecto al control, aunque sí respecto al inhibidor comercial Ro 41-0960 (Figura 5.33).

En el análisis de los resultados obtenidos tras la administración crónica durante cinco días, la Figura 5.33 también muestra que los compuestos fenólicos produjeron un incremento significativo de DA intracelular, que fue muy superior cuando se compara con los datos del tratamiento agudo, en

## 5. Resultados

especial para los compuestos HTy (137,0%) y NO<sub>2</sub>HTy-E (123,6%); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas cuando se compararon ambos tipos de tratamientos en el caso de NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y el inhibidor comercial Ro 41-0960 con porcentajes de aumento de 113,7, 114,3 y 122,5%, respectivamente.

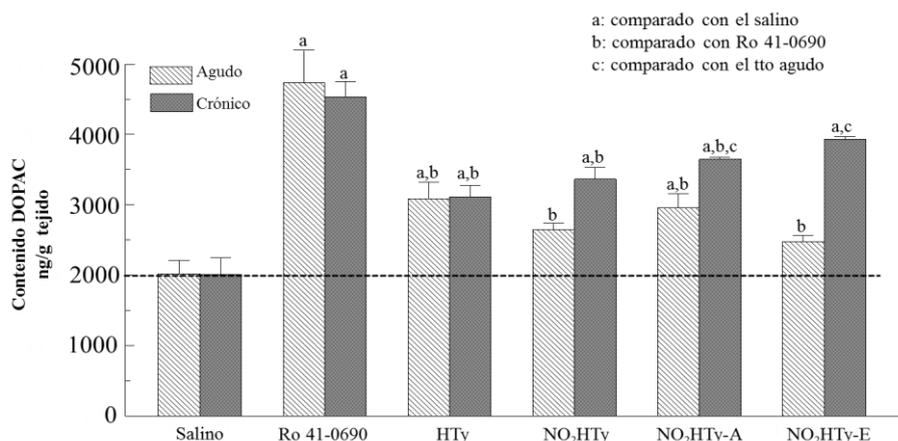


**Figura 5.33**

Efecto de los tratamientos agudo y crónico sobre el contenido de DA en el estriado

El análisis del ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), metabolito de la DA, mostró un aumento significativo del contenido intracelular en el estriado en ambos tratamientos de carácter agudo y crónico (Figura 5.34). Los mayores valores de DOPAC se observaron tras la administración intraperitoneal del inhibidor comercial Ro 41-0960 (agudo, 234,6%; crónico, 225,5%), cuando se comparó con el control salino. De forma similar, la administración de HTy produjo un incremento significativo respecto al control salino, aunque no se hallaron diferencias derivadas del tipo de administración del compuesto (agudo, 152,7%; crónico, 155,1%). Por el contrario, la administración crónica de los compuestos nitroderivados sí arrojó resultados que evidencian un aumento de los niveles de DOPAC tras una administración prolongada en el tiempo. Este hecho se pone especialmente de manifiesto en la Figura 5.34 para los derivados lipofílicos, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E, mostrando un aumento significativo de los niveles del metabolito en comparación con el tratamiento agudo: NO<sub>2</sub>HTy-A (agudo, 146,7%; crónico, 181,8%) y NO<sub>2</sub>HTy-E (agudo, 122,7%; crónico, 195,8%). Por su parte, para el compuesto nitro-precursor, NO<sub>2</sub>HTy, se observó un aumento, aunque no fue significativo, del metabolito tras la administración crónica, frente al tratamiento agudo (agudo, 131,3%; crónico,

167,6%). Como ya se ha descrito anteriormente, el inhibidor comercial Ro 41-0960 ofreció los valores más elevados de DOPAC, en comparación con el grupo control, aunque no se hallaron diferencias significativas entre ambos tipos de tratamientos. En la línea de estos resultados, cabe destacar que el derivado lipofílico NO<sub>2</sub>HTy-E produjo un aumento similar al observado por el inhibidor comercial tras una administración crónica del compuesto (Ro 41-0960, 225,5%; NO<sub>2</sub>HTy-E, 195,8%).

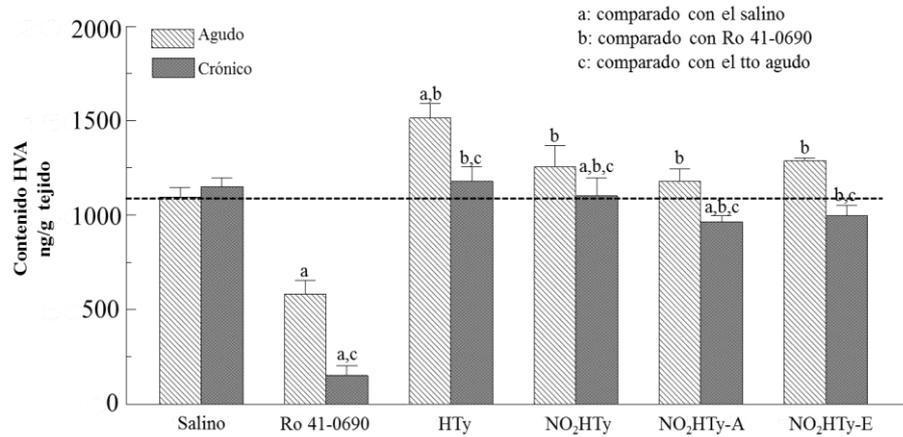


**Figura 5.34**

Efecto de los tratamientos agudo y crónico sobre el contenido de DOPAC en el estriado

El análisis del contenido intracelular en el estriado de otro metabolito de la DA, el ácido homovanílico (HVA), mostró diferencias estadísticamente significativas cuando se administró el inhibidor comercial Ro 41-0960 y se comparó con el grupo control y los compuestos fenólicos. De hecho, la administración crónica de Ro 41-0960 mostró una fuerte reducción en el contenido de HVA en el estriado, el cual, no se observó en el resto de compuestos. No obstante, se puede constatar que la administración crónica produjo una disminución de los niveles del metabolito en comparación con el tratamiento agudo para cada uno de los compuestos fenólicos, aunque no fue significativa respecto al control salino. La Figura 5.35 muestra la notable disminución de los niveles de HVA observada para el compuesto Ro 41-0960 tras su administración crónica (13,1%) y, por parte de los compuestos fenólicos, la menor disminución observada: HTy (102,5%); NO<sub>2</sub>HTy (95,7%); NO<sub>2</sub>HTy-A (83,9%) y NO<sub>2</sub>HTy-E (86,5%).

## 5. Resultados



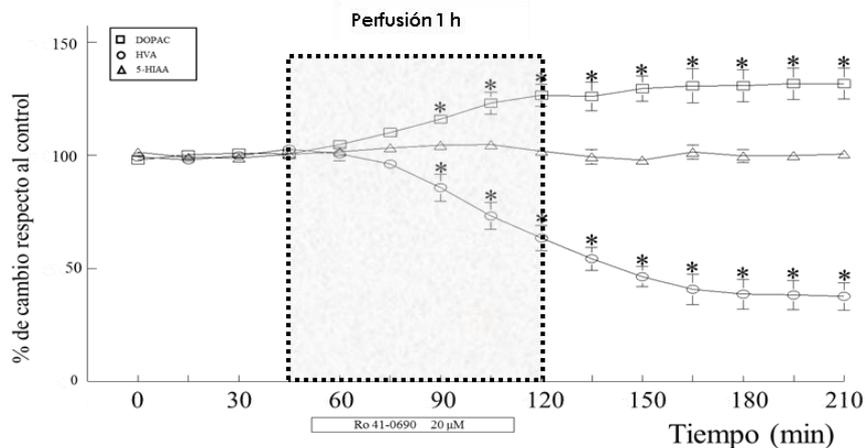
**Figura 5.35**

Efecto de los tratamientos agudo y crónico sobre el contenido de HVA en el estriado

### 5.5.2. Estudio en dializado: microdiálisis

#### 5.5.2.1. Estudio de la perfusión intracerebral de los compuestos

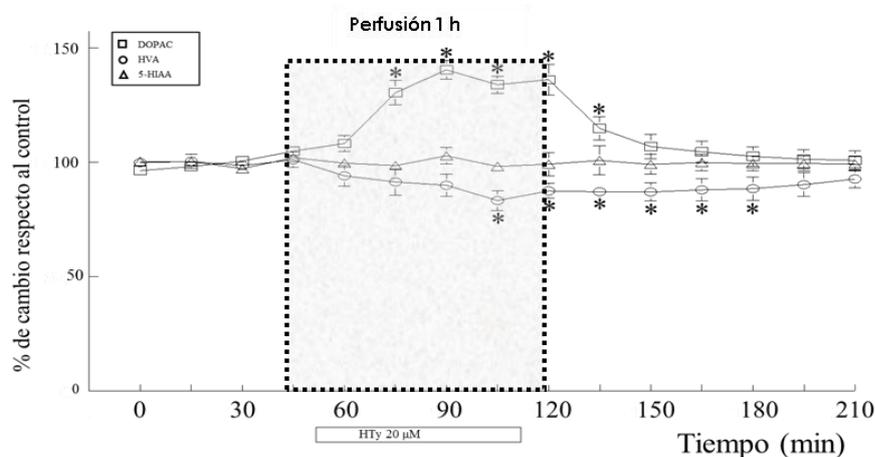
La perfusión del inhibidor comercial **Ro 41-0960**, a una concentración  $20\mu\text{M}$ , produjo un incremento significativo de 136,0% sobre el valor basal de los niveles extracelulares de DOPAC con una respuesta prolongada en el tiempo (Figura 5.36). Al mismo tiempo, se observó una disminución, también estadísticamente significativa, de los valores de HVA, que presentaron la misma tendencia de mantenimiento y larga duración en el tiempo que los de DOPAC. Por el contrario, los valores extracelulares del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) permanecieron constantes en las muestras de dializado durante todo el tiempo que duró el análisis (Figura 5.36).



**Figura 5.36**

Efecto de la perfusión de Ro 41-0960  $20\mu\text{M}$  sobre los niveles de los metabolitos DOPAC, HVA y 5-HIAA en el estriado. \* Muestra diferencias significativas respecto a niveles basales

El estudio del efecto del compuesto fenólico **HTy**, en muestras de dializado, mostró un claro y significativo aumento de los valores de DOPAC respecto a niveles basales con un incremento de 143,5%, que fue superior al obtenido por el inhibidor comercial. Sin embargo, a diferencia de Ro 41-0960, el HTy no presentó un efecto duradero sobre el metabolito DOPAC manteniéndose poco tiempo más que el intervalo de perfusión. Por el contrario, los valores de HVA mostraron una disminución significativa respecto a valores basales, aunque no tan acusada como el compuesto comercial, pero sí sostenida en el tiempo. Los niveles de 5-HIAA se mantuvieron constantes sin cambios significativos (Figura 5.37).

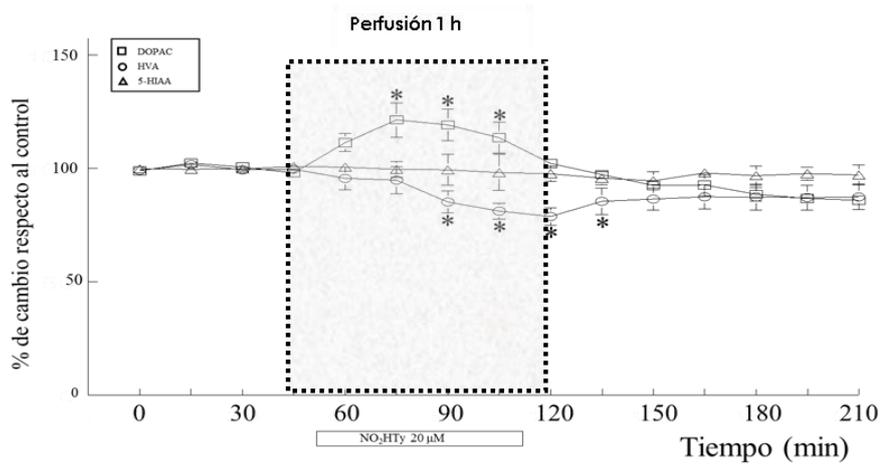


**Figura 5.37**

Efecto de la perfusión de HTy 20 µM sobre los niveles de los metabolitos DOPAC, HVA y 5-HIAA en el estriado. \* Muestra diferencias significativas respecto a niveles basales

La perfusión del nitrocatecol **NO<sub>2</sub>HTy** presentó efecto sobre los metabolitos estudiados proporcional al tiempo de perfusión de una hora. En la Figura 5.38 se puede apreciar un aumento significativo de los niveles extracelulares de DOPAC con un incremento de 125,0% respecto a los valores basales. De igual forma, se obtuvieron diferencias significativas para el metabolito HVA, con una disminución ligeramente más sostenida en el tiempo. No se hallaron diferencias significativas en los valores de 5-HIAA (Figura 5.38).

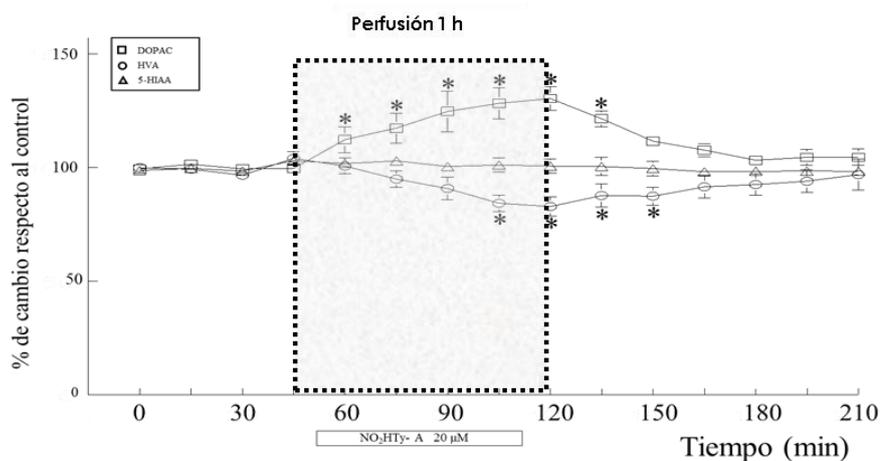
## 5. Resultados



**Figura 5.38**

Efecto de la perfusión de  $\text{NO}_2\text{HTy}$   $20 \mu\text{M}$  sobre los niveles de los metabolitos DOPAC, HVA y 5-HIAA en el estriado. \* Muestra diferencias significativas respecto a niveles basales

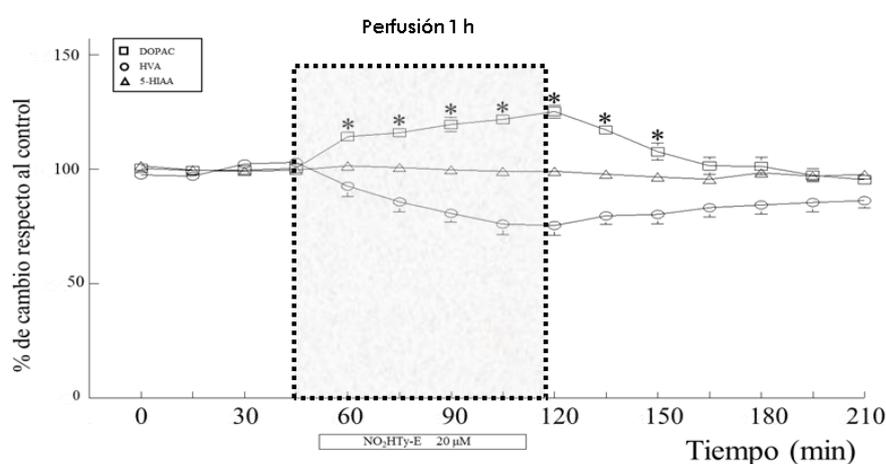
El estudio de perfusión del derivado éster lipofílico,  **$\text{NO}_2\text{HTy-A}$** , condujo a observar un comportamiento sobre los metabolitos estudiados más prolongado en el tiempo. Cabe destacar el incremento de los valores de DOPAC y disminución de HVA respecto a niveles basales estadísticamente significativos (figura 5.39). En particular, se produjo un aumento de 125,0% en los valores de DOPAC y una disminución de 82,9% en los valores de HVA, respecto a las muestras de dializado basales. No se encontraron diferencias significativas para 5-HIAA manteniéndose sus valores constantes durante el tiempo de estudio (Figura 5.39).



**Figura 5.39**

Efecto de la perfusión de  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$   $20 \mu\text{M}$  sobre los niveles de los metabolitos DOPAC, HVA y 5-HIAA en el estriado. \* Muestra diferencias significativas respecto a niveles basales

El derivado éter de carácter también lipofílico, **NO<sub>2</sub>HTy-E**, presentó una tendencia similar a su análogo acílico (Figura 5.40). Es por esto que su efecto fue también prolongado en el tiempo, siguiendo después de la perfusión de dicho compuesto, con diferencias significativas sobre los metabolitos DOPAC y HVA, obteniéndose un incremento en los niveles de DOPAC de 128,0% y una disminución en los niveles de HVA de 75,5%, respecto a los niveles basales. De igual forma a los anteriores compuestos estudiados, los valores de 5-HIAA se mantuvieron constantes sin presentar diferencias significativas a lo largo del tiempo.



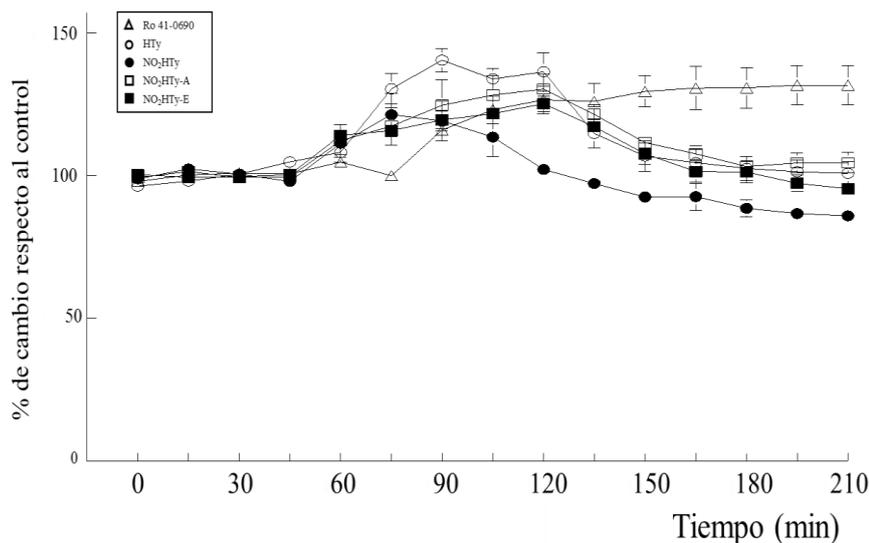
**Figura 5.40**

Efecto de la perfusión de NO<sub>2</sub>HTy-E 20 µM sobre los niveles de los metabolitos DOPAC, HVA y 5-HIAA en el estriado. \* Muestra diferencias significativas respecto a niveles basales

#### 5.5.2.2. Efecto sobre la DA y sus metabolitos

a) En un primer análisis se compara el efecto de los diferentes compuestos estudiados sobre los niveles extracelulares de DOPAC. Con ello se puso de manifiesto la tendencia al aumento de los niveles de este metabolito de la DA respecto a los niveles basales y el tipo de respuesta a lo largo del tiempo (Figura 5.41).

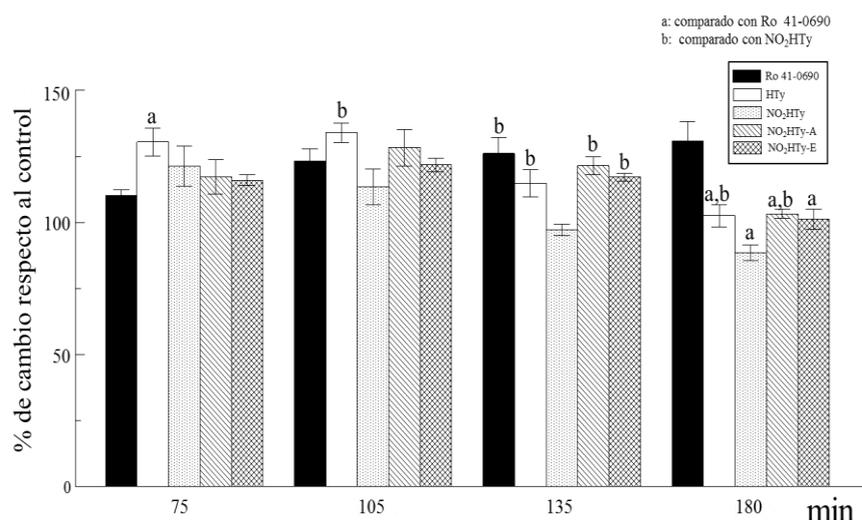
## 5. Resultados



**Figura 5.41**

Efecto de la perfusión 20  $\mu$ M de los compuestos Ro 41-0960, HTy, NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E sobre los niveles de DOPAC en el estriado

b) En un segundo apartado se muestra el análisis del efecto de los compuestos a diferentes tiempos de retención sobre los metabolitos de la DA (DOPAC y HVA), así como el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), estudiados a través de microdiálisis. En la Figura 5.42 se puede observar que los valores extracelulares de **DOPAC** mostraron un incremento significativo a tiempos de 75 y 105 minutos en relación a los niveles basales. En estos tiempos de retención, coincidiendo con el intervalo de perfusión, se observó un incremento en los valores de DOPAC para todos los compuestos estudiados, alcanzando el HTy valores significativamente superiores respecto al propio inhibidor comercial Ro 41-0960. Sin embargo, a tiempo de retención de 135 minutos coincidiendo con el final del tiempo de perfusión, el NO<sub>2</sub>HTy mostró un fuerte descenso de sus valores seguido del HTy. Los nitroderivados lipofílicos, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E, ofrecieron una mejor respuesta manteniendo los valores de DOPAC elevados respecto a niveles basales durante más tiempo. Fuera del tiempo de perfusión, a 180 minutos, todos los compuestos estudiados sufrieron una disminución significativa de sus valores de DOPAC, a excepción de Ro 41-0960 con una tendencia al aumento y, por tanto, prolongada en el tiempo.

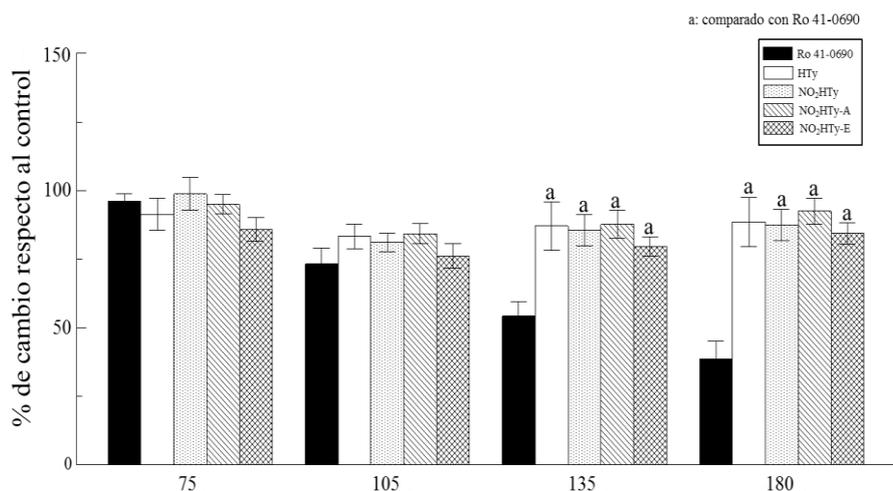


**Figura 5.42**

Estudio comparativo a diferentes tiempos de retención tras la perfusión 20  $\mu$ M de los compuestos Ro 41-0960, HTy, NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E sobre los niveles de DOPAC en el estríado

El estudio de los niveles extracelulares de **HVA** a diferentes tiempos de retención permitió analizar, de igual forma, el comportamiento de los diferentes compuestos a lo largo del tiempo (Figura 5.43). Cabe destacar la fuerte y significativa disminución de los niveles del metabolito por acción del Ro 41-0960, ya apreciable en el minuto 105 y que fue en aumento en los tiempos siguientes. En contraposición, los compuestos fenólicos estudiados no mostraron una disminución acusada de los niveles de HVA. En un desglose por tiempos, a 75 minutos, no fueron significativas las diferencias pero sí a tiempo de 105 minutos. Sin embargo, el efecto sobre los niveles de HVA no fue sostenido en el tiempo, recuperando valores próximos a los basales a tiempo de 135 minutos y 180 minutos. De entre todos los compuestos fenólicos estudiados, el que mostró un efecto más significativo de disminución de los niveles de HVA fue el derivado lipofílico NO<sub>2</sub>HTy-E.

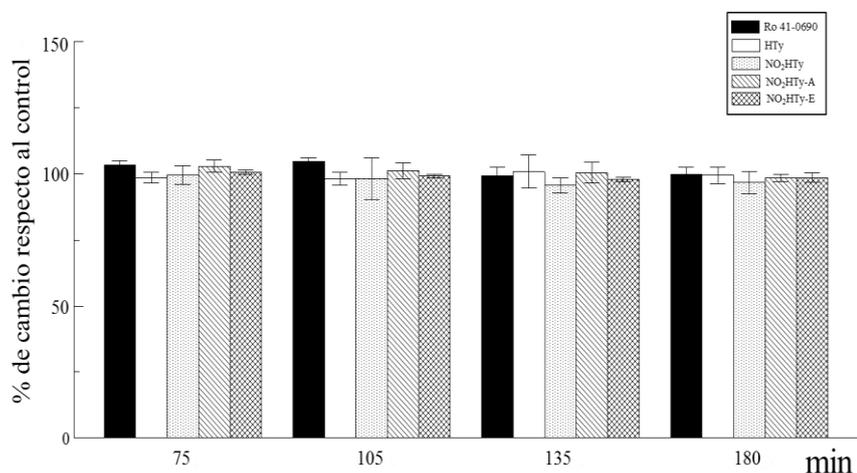
## 5. Resultados



**Figura 5.43**

Estudio comparativo a diferentes tiempos de retención tras la perfusión 20  $\mu$ M de los compuestos Ro 41-0960, HTy, NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E sobre los niveles de HVA en el estradiol

El estudio del efecto de estos compuestos sobre los niveles extracelulares de **5-HIAA**, a diferentes tiempos de retención durante la toma de muestras por microdiálisis cerebral, mostró un comportamiento estable de sus valores que fue sostenido en el tiempo, sin observar ningún cambio significativo en dichos niveles (Figura 5.44).



**Figura 5.44**

Estudio comparativo a diferentes tiempos de retención tras la perfusión 20  $\mu$ M de los compuestos Ro 41-0960, HTy, NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E sobre los niveles de 5-HIAA en el estradiol

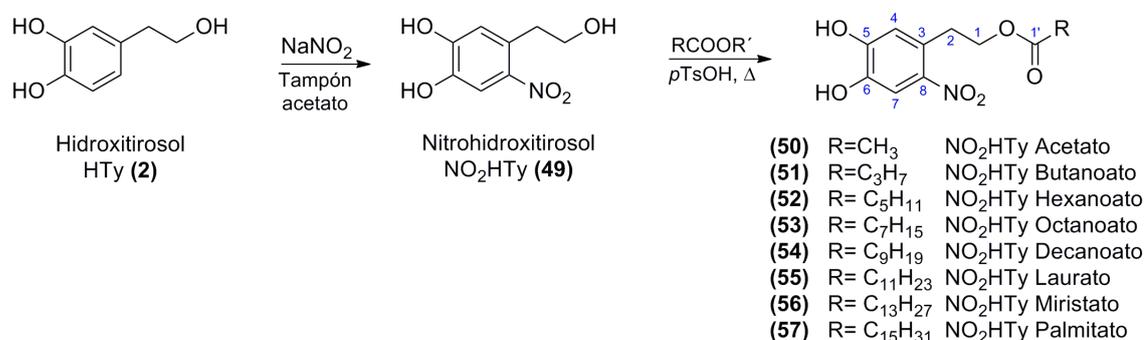
## 6. DISCUSIÓN



## 6.1. Síntesis y determinación estructural de las nuevas sustancias

### 6.1.1. Preparación de ésteres de nitrohidroxitirosol (NO<sub>2</sub>HTy, 49)

La síntesis de los ésteres de NO<sub>2</sub>HTy (**50–57**) se ha llevado a cabo en dos pasos a partir de HTy (**2**). En una primera etapa, se ha hecho reaccionar el HTy con nitrito sódico en condiciones controladas de pH y temperatura para, en una segunda etapa, proceder a la esterificación del NO<sub>2</sub>HTy (**49**) así obtenido mediante un procedimiento propuesto por nuestro grupo y ampliamente utilizado para la esterificación del HTy (Alcudia y cols., 2004; Trujillo y cols., 2006) (Esquema 6.1).



**Esquema 6.1**

Esquema general para la síntesis de los nuevos ésteres de nitrohidroxitirosol

Para ello se ha utilizado HTy aislado y purificado a partir del alpeorujo como material de partida. En el primer paso se ha utilizado un procedimiento descrito previamente por Napolitano y cols. (2004), y que ha sido ligeramente modificado en esta Tesis, lo que ha permitido aumentar el rendimiento del 60 al 80% en la nitración del HTy de partida. Dichas modificaciones han consistido en la utilización de una mayor concentración y un menor tiempo de reacción, consiguiéndose de esta manera minimizar la sobrenitración del anillo aromático. El NO<sub>2</sub>HTy, obtenido como un sólido amarillo, ha sido esterificado posteriormente por reacción con el correspondiente éster metílico o etílico (acetato [C2:0], butanoato [C4:0], hexanoato [C6:0], octanoato [C8:0], decanoato [C10:0], laurato [C12:0], miristato [C14:0] o palmitato [C16:0]) en presencia de ácido *p*-toluenosulfónico (*p*TsOH) como catalizador ácido (Trujillo y cols., 2006). Así se han obtenido ocho ésteres de nitrohidroxitirosilo, **50–57** (Esquema 6.1), cuya síntesis se describe por primera vez en esta Memoria, con

rendimientos que han variado entre moderados y excelentes (véase apartado 5.1).

Todas las nuevas sustancias obtenidas han sido caracterizadas tanto por sus puntos de fusión (sólidos), como por sus espectros de RMN y EM (tanto de baja como de alta resolución). Su determinación estructural se ha realizado fundamentalmente en base a la aplicación de diversas experiencias de RMN (COSY, NOESY, HSQC, HMBC), habiéndose asignado de forma inequívoca todas las señales que aparecen en sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN.

### **6.1.2. Determinación estructural de los ésteres derivados de nitrohidroxitirosol**

#### *6.1.2.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)*

En las Tablas 6.1 y 6.2 se presentan los datos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN de los nuevos ésteres derivados de nitrohidroxitirosol (**50–57**), comparados con los datos correspondientes a HTy (**2**) y  $\text{NO}_2\text{HTy}$  (**49**).

Tabla 6.1

Datos de  $^1\text{H}$  RMN (500,13 MHz, DMSO- $d_6$ , 303K) para los compuestos **2**, **49** y **50–57**. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz

	<b>2</b>	<b>49</b>	<b>50</b>	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>53</b>	<b>54</b>	<b>55</b>	<b>56</b>	<b>57</b>
<b>Unidad de fenilo</b>										
1	3,49 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,56 (t) ( $J_{1,2} = 6,8$ )	4,18 (t) ( $J_{1,2} = 6,6$ )	4,20 (t) ( $J_{1,2} = 6,5$ )	4,20 (t) ( $J_{1,2} = 6,6$ )	4,20 (t) ( $J_{1,2} = 6,5$ )				
2	2,52 (t)	2,90 (t)	3,06 (t)	3,07 (t)						
4	6,57 (d) ( $J_{4,8} = 2,0$ )	6,75 (s)	6,74 (s)	6,73 (s)	6,73 (s)	6,73 (s)	6,74 (s)	6,73 (s)	6,73 (s)	6,73 (s)
7	6,60 (d) ( $J_{7,8} = 8,0$ )	7,43 (s)	7,46 (s)	7,46 (s)	7,46 (s)	7,47 (s)	7,47 (s)	7,47 (s)	7,46 (s)	7,47 (s)
8	6,42 (dd)									
<b>Cadena acílica</b>										
2'		1,94 (s)	2,20 (t) ( $^3J = 7,2$ )	2,20 (t) ( $^3J = 7,4$ )	2,20 (t) ( $^3J = 7,4$ )	2,21 (t) ( $^3J = 7,4$ )	2,21 (t) ( $^3J = 7,4$ )	2,20 (t) ( $^3J = 7,4$ )	2,20 (t) ( $^3J = 7,4$ )	2,20 (t) ( $^3J = 7,4$ )
3'			1,48 (m)	1,45 (m)	1,45 (m)	1,45 (m)	1,44 (m)	1,44 (m)	1,44 (m)	1,44 (m)
4'			0,81 (t) ( $^3J = 7,4$ )	1,21 (m)	1,21 (m)	1,22 (m)				
5'				"	"	"	"	"	"	"
6'				0,82 (t) ( $^3J = 7,4$ )	"	"	"	"	"	"
7'					"	"	"	"	"	"
8'					0,82 (t) ( $^3J = 7,4$ )	"	"	"	"	"
9'						"	"	"	"	"
10'						0,84 (t) ( $^3J = 6,9$ )	"	"	"	"
11'							"	"	"	"
12'							0,84 (t) ( $^3J = 6,9$ )	"	"	"
13'								"	"	"
14'								0,84 (t) ( $^3J = 6,9$ )	"	"
15'									"	"
16'										0,84 (t) ( $^3J = 6,9$ )

## 6. Discusión

**Tabla 6.2**  
 Datos de  $^{13}\text{C}$  RMN (125,76 MHz, DMSO- $d_6$ , 303k) para los compuestos **2**, **49** y **50–57**.  
 Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm

	<b>2</b>	<b>49</b>	<b>50</b>	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>53</b>	<b>54</b>	<b>55</b>	<b>56</b>	<b>57</b>
<b>Unidad de fenilo</b>										
1	62,5	61,0	63,4	63,2	63,2	63,2	63,2	63,2	63,2	63,2
2	38,4	36,0	31,8	31,9	31,8	31,9	31,8	31,8	31,8	31,8
3	130,1	127,8	126,2	126,3	126,2	126,3	126,2	126,2	126,2	126,2
4	116,2	118,5	118,4	118,5	118,4	118,4	118,4	118,4	118,4	118,4
5	144,8	150,9	151,2	151,2	151,2	151,2	151,1	151,2	151,2	151,2
6	143,2	143,7	144,2	144,2	144,1	144,2	144,1	144,1	144,1	144,1
7	115,3	112,0	112,2	112,2	112,2	112,2	112,2	112,2	112,2	112,2
8	119,3	139,7	139,8	139,7	139,7	139,7	139,7	139,7	139,7	139,7
<b>Cadena acíclica</b>										
1'			170,2	172,5	172,7	172,7	172,6	172,6	172,7	172,6
2'			20,6	35,3	33,4	33,5	33,4	33,4	33,4	33,4
3'				17,8	24,0	24,4	24,2	24,3	24,3	24,3
4'				13,3	30,5	28,4-28,3	28,7-28,3	28,9-28,3	29,0-28,3	29,0-28,3
5'					21,7	"	"	"	"	"
6'					13,7	31,1	"	"	"	"
7'						22,0	"	"	"	"
8'						13,9	31,2	"	"	"
9'							22,0	"	"	"
10'							13,8	31,2	"	"
11'								22,0	"	"
12'								13,9	31,2	"
13'									22,0	"
14'									13,9	31,2
15'										22,0
16'										13,9

En la Tabla 6.1 se observa cómo al pasar del HTy (**2**) al NO<sub>2</sub>HTy (**49**) se modifica tanto el número de señales como el patrón de acoplamiento en la zona de los protones aromáticos (6–8 ppm), debido a la introducción del grupo nitro, pasando de tres señales a 6,57 (doblete, H<sub>4</sub>), 6,60 (doblete H<sub>7</sub>) y 6,42 ppm (doble doblete, H<sub>8</sub>) en el caso del HTy (Figura 6.1.A) a sólo dos a 6,75 (H<sub>4</sub>) y 7,43 ppm (H<sub>7</sub>), en el caso del NO<sub>2</sub>HTy, apareciendo ambos en este caso como singuletes, por la incorporación del grupo nitro en posición 8 de dicho anillo (Figura 6.1.B). La presencia de este grupo nitro permite explicar además por qué estas últimas señales aparecen desapantalladas respecto a las comentadas para el caso del HTy, siendo ello especialmente evidente para la señal correspondiente a H<sub>7</sub> que pasa de 6,60 a 7,43 ppm ( $\Delta\delta = + 0,83$  ppm) tras la incorporación del grupo nitro en *orto*. Respecto a los espectros de carbono-13, es de resaltar la importante modificación en el desplazamiento químico de C<sub>8</sub> que pasa de 119,3 a 139,7 ppm ( $\Delta\delta = + 20,4$  ppm) debido a la introducción del grupo nitro en esa posición. Todos estos datos nos permiten confirmar la presencia del grupo nitro en posición 8, introducido en la primera etapa del esquema sintético antes mencionado.

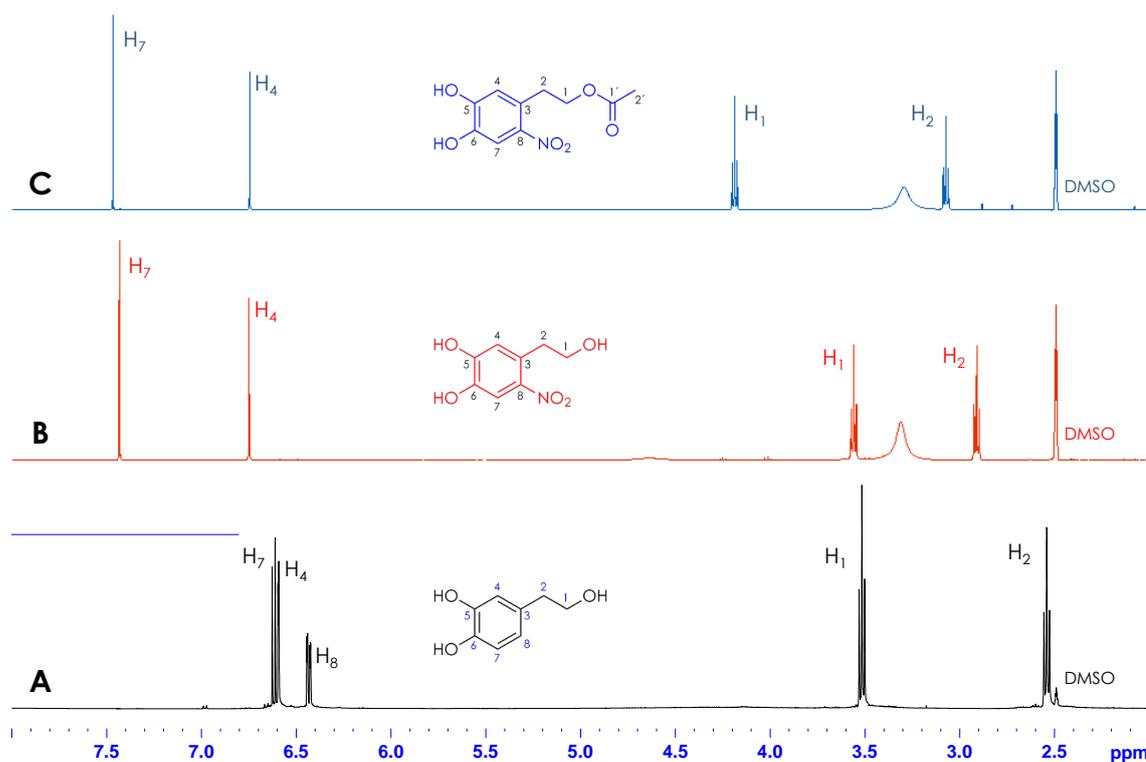


Figura 6.1

Comparación de señales en los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de los compuestos **2** (A), **49** (B) y **50** (C)

Por otra parte, se puede observar en la Tabla 6.1 que al pasar del NO<sub>2</sub>HTy (**49**) a la serie de sus nuevos ésteres sintetizados (**50–57**), las señales comentadas para H<sub>4</sub> y H<sub>7</sub> se mantienen prácticamente constantes en sus valores de desplazamiento químico, lo cual indica que el grupo nitro se mantiene estable en todos ellos (véase Figura 6.1.B y 6.1.C). En cambio, si se observa un desplazamiento hacia campo bajo ( $\Delta\delta \approx + 0,6$  ppm) de la señal correspondiente a H<sub>1</sub>, debido a la esterificación producida precisamente en esta posición 1. La aparición de señales adicionales asignadas a los protones en las diversas posiciones (2' a 16') de la cadena lateral en cada uno de los derivados preparados, permite igualmente confirmar la funcionalización del OH alcohólico presente inicialmente con el ácido carboxílico correspondiente en cada caso.

Estos datos se ven también corroborados en la Tabla 6.2, observándose en todos los espectros de <sup>13</sup>C-RMN de los nuevos ésteres (**50–57**) la aparición de una señal sobre 172 ppm, de fácil asignación al carbono carboxílico (C<sub>1'</sub>) de la cadena acídica introducida en 1, así como una ligera modificación de la señal del carbono en posición 2, debida al efecto apantallante β producido por la presencia de dicho sustituyente. Por último, resaltar que la señal asignada al carbono 8, que porta el grupo nitro, se mantiene prácticamente constante en toda la serie de ésteres derivados sintetizados (**50–57**), como era de esperar.

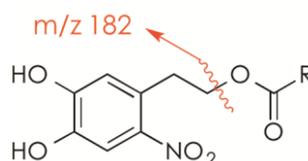
### 6.1.2.2. Espectrometría de masas (EM)

En cuanto a los datos obtenidos en sus correspondientes espectros de masas, se puede observar una serie de picos característicos que corroboran la estructura propuesta para estos derivados (Tabla 6.3).

**Tabla 6.3**  
Principales iones registrados y sus abundancias relativas (%)  
obtenidos mediante CI para los compuestos **49** y **50–57**

Ión		<b>49</b>	<b>50</b>	<b>53</b>	<b>54</b>	<b>55</b>	<b>57</b>
[M+H] <sup>+</sup>	m/z	200	242	326	354	-	-
	%	(12)	(0,1)	(0,1)	(0,1)		
[MH-31] <sup>+</sup>	m/z	169	211	295	323	351	407
	%	(4,0)	(2,3)	(3,0)	(10)	(12)	(22)
m/z = 182	%	(100)	(100)	(100)	(100)	(50)	(53)
m/z = 166	%	(16)	(13)	(17)	(44)	(22)	(27)
m/z = 164	%	(4,0)	(18)	(21)	(36)	(20)	(17)
m/z = 152	%	(28)	(23)	(23)	(37)	(31)	(47)
m/z = 151	%	(3,5)	(7,6)	(8,8)	(20)	(65)	(100)
m/z = 136	%	(33)	(23)	(16)	(29)	(13)	(15)
RCOOH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	m/z		61	145	173	201	257
	%		(15)	(11)	(41)	(100)	(64)
RCO <sup>+</sup>	m/z			127	155	183	239
	%			(21)	(39)	(26)	(22)

En esta tabla se puede comprobar cómo el ión cuasimolecular [M+H]<sup>+</sup> es relativamente abundante para el NO<sub>2</sub>HTy (**49**), pero es casi imperceptible para la serie de derivados acilados. No obstante, en cada caso aparece un conjunto de iones comunes que dan cuenta de la estructura propuesta para cada derivado. Son de resaltar en este sentido los iones [MH-31]<sup>+</sup>, RCOOH<sub>2</sub><sup>+</sup> y RCO<sup>+</sup>, observados en toda la serie analizada. Estos últimos se producirían por fragmentación de la cadena acílica, presente en la posición 1, llegando alguno de ellos a ser el pico base del espectro (100%), como es el caso del compuesto **55**. En la mayoría de los restantes casos, el pico base corresponde a un ión que aparece a m/z 182, cuya formación se puede explicar fácilmente por fragmentación de la cadena lateral (Esquema 6.2).



**Esquema 6.2**

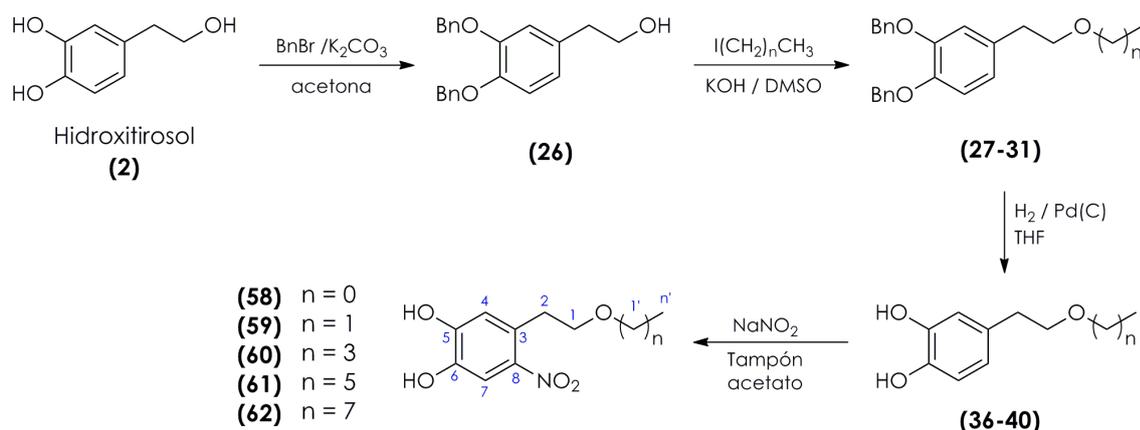
Formación del ión m/z 182, observado en los espectros de masas de los compuestos **49–57**

Además, el estudio de la composición del ión molecular [M]<sup>+</sup> mediante espectrometría de masas de alta resolución de los compuestos **50–57** nos ha

permitido confirmar la masa molecular calculada en cada caso, con una desviación de masa que varía entre 0 y 3,0 ppm (véase apartado 5.1.1).

### 6.1.3. Preparación de éteres alquílicos de nitrohidroxitirosol

La síntesis de los éteres derivados de nitrohidroxitirosol ha necesitado de cuatro pasos (Esquema 6.3).



**Esquema 6.3**

Esquema general para la síntesis de los nuevos éteres de nitrohidroxitirosol

En el primer paso se ha procedido a la protección de los OH fenólicos presentes en el HTy, en forma de bencil éteres (26), con el fin de evitar que reaccionen en el siguiente paso. En la segunda etapa se ha procedido a la introducción de una cadena alquílica, de longitud variable, en el OH alcohólico libre, mediante el uso de los ioduros de alquilo correspondientes como agentes alquilantes, obteniéndose los éteres protegidos (27-31). La siguiente etapa ha consistido en la desprotección de los OH fenólicos, mediante la hidrogenolisis de los grupos bencilo, obteniéndose los correspondientes alquil éteres de HTy libres (36-40), que finalmente han sido sometidos a la reacción de nitración, en condiciones similares a las descritas para la síntesis de los ésteres derivados (véase apartado 4.1.4), rindiendo los compuestos 58-62, descritos por primera vez en esta Memoria.

Los rendimientos químicos obtenidos en la reacción de nitración final han sido en general aceptables, variando entre el 63 y el 74%, obteniéndose todos los compuestos puros mediante columna de cromatografía. Indicar que en

esta etapa de purificación se producía inicialmente una gran pérdida de producto, posiblemente retenido por la fase estacionaria utilizada (gel de sílice) que hacía disminuir enormemente el rendimiento químico del procedimiento. Se han probado otras sustancias inertes como fase estacionaria (alúmina, C18) pero sin resultado. Finalmente, la adición de una pequeña cantidad de ácido fórmico (1%) al eluyente utilizado en cada caso permitió solventar, en parte, este problema.

Al igual que en el caso de los ésteres, todas las nuevas sustancias obtenidas han sido caracterizadas tanto por sus puntos de fusión (sólidos), como por sus espectros de RMN y EM (tanto de baja como de alta resolución). Su determinación estructural se ha realizado fundamentalmente en base a la aplicación de diversas experiencias de RMN (COSY, NOESY, HSQC, HMBC), habiéndose asignado de forma inequívoca todas las señales que aparecen en sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN.

#### **6.1.4. Determinación estructural de los éteres derivados de nitrohidroxitirosol**

##### *6.1.4.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)*

En las Tablas 6.4 y 6.5 se presentan los datos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN de los nuevos éteres derivados de  $\text{NO}_2\text{HTy}$  (**58–62**), comparados con los datos correspondientes a HTy (**2**) y  $\text{NO}_2\text{HTy}$  (**49**).

**Tabla 6.4**

Datos de  $^1\text{H}$  RMN (500,13 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , 303K) para los compuestos **2**, **49** y **58–62**. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz

	<b>2</b>	<b>49</b>	<b>58</b>	<b>59</b>	<b>60</b>	<b>61</b>	<b>62</b>
<b>Unidad de fenétilo</b>							
1	3,49 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,56 (t) ( $J_{1,2} = 6,8$ )	3,48 (t) ( $J_{1,2} = 6,6$ )	3,51 (t) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	3,51 (t) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	3,50 (t) ( $J_{1,2} = 6,5$ )	3,50 (t) ( $J_{1,2} = 6,7$ )
2	2,52 (t)	2,90 (t)	2,99 (t)				
4	6,57 (d) ( $J_{4,8} = 2,0$ )	6,75 (s)	6,75 (s)	6,76 (s)	6,75 (s)	6,75 (s)	6,75 (s)
7	6,60 (d) ( $J_{7,8} = 8,0$ )	7,43 (s)	7,45 (s)	7,44 (s)	7,44 (s)	7,44 (s)	7,44 (s)
8	6,42 (dd)						
<b>Cadena alquílica</b>							
1'			3,21 (s)	3,39 (c) ( $^3J = 7,0$ )	3,33 (t) ( $^3J = 6,5$ )	3,32 (t) ( $^3J = 6,6$ )	3,22 (t) ( $^3J = 6,6$ )
2'				1,06 (t)	1,42 (q)	1,43 (q)	1,43 (q)
3'					1,26 (h)	1,22 (m)	1,22 (m)
4'					0,84 (t) ( $^3J = 7,0$ )	"	"
5'						"	"
6'						0,83 (t) ( $^3J = 7,0$ )	"
7'							"
8'							0,84 (t) ( $^3J = 7,0$ )

**Tabla 6.5**  
 Datos de  $^{13}\text{C}$  RMN (125,76 MHz, DMSO- $d_6$ , 303k) para los compuestos **2**, **49** y **58–62**.  
 Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm

	<b>2</b>	<b>49</b>	<b>58</b>	<b>59</b>	<b>60</b>	<b>61</b>	<b>62</b>
<b>Unidad de fenilo</b>							
1	62,5	61,0	71,7	69,6	69,8	69,9	69,9
2	38,4	36,0	32,5	32,8	32,8	32,7	32,7
3	130,1	127,8	127,3	127,3	127,4	127,4	127,4
4	116,2	118,5	118,4	118,3	118,4	118,4	118,3
5	144,8	150,9	151,0	151,0	151,0	151,0	151,0
6	143,2	143,7	143,9	143,9	143,8	143,8	143,8
7	115,3	112,0	112,0	112,0	112,0	112,0	112,0
8	119,3	139,7	139,6	139,8	139,8	139,8	139,7
<b>Cadena alquílica</b>							
1'			57,8	65,2	69,6	69,8	69,8
2'				15,0	31,2	29,1	29,1
3'					18,8	25,3	25,6
4'					13,7	31,0	28,7
5'						22,0	28,6
6'						13,8	31,2
7'							22,0
8'							13,9

Se puede observar en la Tabla 6.4 que en toda la serie de los nuevos éteres de nitrohidroxitirosilo sintetizados (**58–62**) aparecen de nuevo, en la zona de los protones aromáticos, sólo dos señales que se asignan fácilmente a H<sub>4</sub> y H<sub>7</sub> por analogía con el propio NO<sub>2</sub>HTy (**49**). Dichas señales además, se mantienen prácticamente constantes en sus valores de desplazamiento químico, lo cual confirma que el grupo nitro se ha incorporado en todos ellos en posición 8, tal como ya se discutió en el apartado 6.1.2.1. En esta ocasión la señal correspondiente a H<sub>1</sub> se modifica sólo muy ligeramente, debido a que la presencia de un grupo alquilo en esa posición prácticamente no tiene un efecto significativo. La aparición de señales adicionales asignadas a los protones en las diversas posiciones (1' a 8') de la cadena lateral en cada uno de los derivados preparados, permite igualmente confirmar la funcionalización

del OH alcohólico presente inicialmente con la cadena alquílica correspondiente en cada caso.

Estos datos se ven también corroborados en la Tabla 6.5, observándose en todos los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de los nuevos éteres (**58–62**) un desplazamiento a campo bajo ( $\Delta\delta \approx +10$  ppm) de la señal correspondiente a  $\text{C}_1$  debido a la presencia de la cadena alquílica presente, así como una ligera modificación de nuevo de la señal del carbono en posición 2, debida al efecto apantallante  $\beta$  producido por la presencia de dicho sustituyente. Por último, resaltar que, como en el caso de los ésteres ya comentado, la señal asignada al carbono 8 que porta el grupo nitro, se mantiene prácticamente constante en toda la serie de éteres derivados sintetizados (**58–62**), como era de esperar.

#### 6.1.4.2. Espectrometría de masas (EM)

En cuanto a los datos obtenidos en sus correspondientes espectros de masas, se puede observar una serie de picos característicos que corroboran de nuevo la estructura propuesta para estos derivados (Tabla 6.6).

**Tabla 6.6**  
Principales iones registrados y sus abundancias relativas (%) obtenidos mediante CI para los compuestos **49** y **58–62**

Ión		<b>49</b>	<b>58</b>	<b>59</b>	<b>60</b>	<b>61</b>	<b>62</b>
[M+H] <sup>+</sup>	m/z	200	214	228	256	284	312
	%	(12)	(7,0)	(5,0)	(5,0)	(4,0)	(10)
[MH-18] <sup>+</sup>	m/z	182	196	210	238	266	294
	%	(*)	(3,5)	(3,0)	(2,0)	(2,0)	(5,2)
[MH-31] <sup>+</sup>	m/z	169	183	197	225	253	281
	%	(4,0)	(16)	(4,5)	(5,3)	(10)	(12)
m/z = 182	%	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
m/z = 166	%	(16)	(11)	(14)	(21)	(19)	(20)
m/z = 164	%	(4,0)	(12)	(8,8)	(7,6)	(7,0)	(7,0)
m/z = 152	%	(28)	(16)	(15)	(28)	(32)	(37)
m/z = 151	%	(3,5)	(8,0)	(5,3)	(4,0)	(3,5)	(4,0)
m/z = 136	%	(33)	(20)	(15)	(13)	(10)	(10)

Como se puede comprobar en la Tabla 6.6, en esta ocasión el ión cuasimolecular [M+H]<sup>+</sup> aparece en los espectros de masas de todos los compuestos sintetizados, aunque su abundancia relativa es más bien baja. Por

otra parte, se vuelve a observar una serie de iones comunes que dan cuenta igualmente de la estructura propuesta para estas sustancias, y que ya aparecían en los espectros anteriormente comentados de los derivados acilados. En todos los éteres derivados el pico base del espectro corresponde al ión que aparece a  $m/z$  182, cuya formación ya se ha explicado en el esquema 6.2 del apartado 6.1.2.2.

Además, de nuevo, el estudio de la composición del ión molecular  $[M]^{+•}$  mediante espectrometría de masas de alta resolución de los compuestos **58-62** nos ha permitido confirmar tanto la fórmula empírica esperada como la masa molecular calculada en cada caso, con una desviación de masa menor en todos los casos de 2,5 ppm (véase apartado 5.1.2).

## 6.2. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los nitroderivados lipofílicos de HTy

A partir de los compuestos sintetizados y descritos en el apartado anterior, derivados acílicos (**50-57**) y alquílicos de nitrohidroxitirosilo (**59-62**), se caracterizó la capacidad antioxidante en comparación con los precursores nitrohidroxitirosol ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ , **49**) e hidroxitirosol (HTy, **2**), con el fin de conocer la influencia que la estructura química ejerce sobre la potencia antioxidante.

Los métodos que se utilizan para determinar la actividad antioxidante se basan en la comprobación de cómo un agente oxidante induce un daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. Otros ensayos, en cambio, se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. Por todo ello, existe una gran variedad de métodos para determinar la actividad antioxidante que difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la medida del punto final, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el método de reacción. Con el fin de alcanzar una mejor aproximación a la capacidad antioxidante real del compuesto o muestra, es aconsejable emplear varios métodos, ya que cada uno ofrece información diferente y complementaria. Con este propósito, se discuten los

resultados obtenidos de la evaluación de la capacidad antioxidante de los compuestos puros mediante el ensayo FRAP, que determina la capacidad reductora y los ensayos ABTS y ORAC que evalúan la capacidad de secuestro de radicales libres.

En un primer análisis de los resultados obtenidos tras el desarrollo de los métodos FRAP, ABTS y ORAC se extrae como conclusión principal que la adición de un grupo fuertemente electronegativo, grupo nitro, a la estructura química de HTy induce un positivo y significativo incremento en la actividad antioxidante. Esta capacidad antioxidante mejorada de NO<sub>2</sub>HTy en comparación con su precursor natural presente en el aceite, HTy, está de acuerdo a la estabilización descrita para el radical fenoxilo con sustituyentes electro-donadores en posiciones "orto" (Pokorny, 1987; Chimi y cols., 1991).

Además del efecto que el grupo nitro ejerce sobre la capacidad antioxidante, la longitud de la cadena hidrocarbonada lateral de los nitroderivados alquílicos y acílicos también influye en la actividad de estos compuestos. Así, los nitrocatecoles de cadena corta (de 2 a 4 átomos de carbono) mantuvieron e incluso aumentaron la actividad del propio precursor (**49**), mientras que una longitud mayor de la cadena hidrocarbonada ( $\geq 6$  átomos de carbono) provocó un efecto negativo sobre la actividad antioxidante especialmente para los más lipofílicos. Estos resultados muestran una relación parabólica entre la potencia antioxidante y la naturaleza lipofílica de los nitroderivados de HTy o incremento del tamaño de la cadena lateral hidrocarbonada. Aunque la serie alquílica no incluía los homólogos de los compuestos acilados decanoato (**54**), laurato (**55**), miristato (**56**) y palmitato (**57**) de nitrohidroxitirosilo, si se pudo confirmar el mismo comportamiento parabólico entre la actividad y la longitud de la cadena lateral.

De cualquier forma, los resultados de la actividad antioxidante de ambas series están en desacuerdo con la paradoja polar que asume una linealidad entre la actividad antioxidante y naturaleza lipofílica, siendo los antioxidantes polares más efectivos en aceite y/o grasa mientras que los antioxidantes no polares, más activos en emulsiones o sistemas biológicos (Porter y cols., 1989).

Teniendo en cuenta que las técnicas utilizadas (ensayos FRAP, ABTS, ORAC) determinan la capacidad antioxidante en medios no grasos, los resultados presentados demuestran que un incremento de la hidrofobicidad no siempre conduce a un incremento de la eficacia antioxidante en estos ambientes no grasos, como indica la paradoja polar, sin embargo están de acuerdo a otros resultados previamente descritos por el equipo de investigación para derivados del HTy, ésteres (Mateos y cols., 2008) y éteres de hidroxitirosilo (Pereira-Caro y cols., 2009), otros derivados acílicos del alcohol homovanílico (Madrona y cols., 2011), además de aquellos descritos por otros autores con derivados acílicos del ácido clorogénico (Laguerre y cols., 2009) y rosmarínico (Laguerre y cols., 2010), entre otros.

Este comportamiento parabólico se ha descrito también en otros sistemas biológicos al estudiar comparativamente la actividad biológica de una serie de compuestos derivados homólogos de creciente naturaleza lipofílica. Así, estudios que evaluaban la citotoxicidad de derivados acílicos de ácido gálico en células de leucemia L1210 (Locatelli y cols., 2008), la actividad antiplaquetaria de los éteres de hidroxitirosilo en sangre de voluntarios sanos (Reyes y cols., 2013) y tras la administración oral en ratas (Muñoz-Marín y cols., 2013) así como la actividad citotóxica de éteres de hidroxitirosilo contra células cancerígenas de pulmón A549 (Calderón-Montano y cols., 2013), han demostrado que un tamaño de cadena intermedia presentaba mayor actividad que aquellos compuestos con cadenas más largas y por tanto más lipofílicos.

En este sentido, Laguerre y cols (2013) han postulado recientemente el llamado efecto “*cut-off*” que justifica la no linealidad del carácter antioxidante en ambientes no grasos. Estos autores relacionan la menor actividad de los compuestos más lipofílicos, y por tanto de mayor tamaño, a una movilidad reducida y a fenómenos de auto-agregación o de internalización en la fase orgánica (Shahidi y Zhong, 2011; Laguerre y cols., 2013, 2014).

Por otra parte, el análisis comparativo de la actividad antioxidante de los compuestos nitroderivados que presentan la misma longitud de la cadena lateral pero distinta naturaleza química (serie acílica vs serie alquílica), mostró que los compuestos de la serie alquílica eran ligeramente menos activos que

aquellos de la serie acíclica, aunque este efecto referente a la naturaleza del enlace fue menos influyente sobre la actividad antioxidante que la ejercida por el tamaño de la cadena lateral.

Por último, al comparar los resultados obtenidos de la caracterización de la capacidad reductora (Ensayo FRAP) con los correspondientes a la capacidad de secuestro de radicales libres (Ensayos ABTS y ORAC), los nitroderivados de HTy destacaron, en general, por presentar una mayor capacidad de captación de radicales libres que potencial reductor, en particular los compuestos más lipofílicos. Estos resultados podrían estar señalando a la actividad de secuestro de radicales libres como el mecanismo preferente de actuación antioxidante de los nitroderivados de HTy.

En base a todo lo expuesto, los nitroderivados acíclicos y alquílicos de HTy representan un conjunto de compuestos de marcada actividad antioxidante y en particular, aquellos con cadena lateral más corta. Apelando a la mayor capacidad antioxidante del acetato de nitrohidroxitirosilo ( $\text{NO}_2\text{HTy-A}$ , **50**) y etil éter de nitrohidroxitirosilo ( $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ , **59**), mejores rendimientos de síntesis y también, mejorado balance hidrófilo/lipófilo, se seleccionaron estos compuestos para acometer los estudios biológicos presentados en esta memoria en comparación con el precursor nitrohidroxitirosol ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ , **49**) y otros según el objetivo perseguido.

### 6.3. Determinación de la biodisponibilidad y metabolismo de los nitroderivados de HTy

Antes de evaluar el potencial nutracéutico y terapéutico de los nitroderivados de HTy, se consideró de especial interés evaluar la biodisponibilidad o absorción de estos compuestos y su metabolización, a fin de conocer el compuesto o metabolito biológicamente activo (Kroon y cols., 2004). Los estudios *in vivo* basados en el análisis de muestras de sangre y orina de animales y humanos, aparte de resultar caros y complejos, no permiten distinguir entre la contribución del intestino, hígado, riñón u otros órganos en la biotransformación de los compuestos fenólicos. Por ello, se utilizan ciertos modelos celulares que ayudan a dilucidar las rutas metabólicas que tiene

lugar en nuestro organismo. Así, en el presente estudio se han seleccionado dos modelos celulares de colon e hígado para ahondar en la biodisponibilidad y biotransformación de los nitroderivados a nivel intestinal y hepático.

### 6.3.1. Transporte y metabolismo a nivel intestinal

En primer lugar, se ha procedido al estudio comparativo de la absorción y metabolismo de los nitroderivados de HTy a través de la barrera intestinal. Para ello, se ha empleado un modelo *in vitro* de células de carcinoma de colon humano, Caco-2, dada la semejanza morfológica y funcional con las células del epitelio intestinal humano y que constituye un sistema bien establecido para la valoración de la absorción de fitoquímicos por el epitelio intestinal (FDA, 2000).

Los datos presentados en esta tesis muestran que NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E son eficientemente absorbidos a través de las células epiteliales del intestino. En particular, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E han presentado mayores tasas de absorción que el compuesto NO<sub>2</sub>HTy, observando una relación directa entre la naturaleza lipofílica y grado de absorción. Estos resultados ponen de manifiesto la influencia que la cadena hidrocarbonada ejerce sobre la biodisponibilidad del compuesto. Sin embargo no se ha encontrado diferencia entre el grado de absorción del derivado acílico, NO<sub>2</sub>HTy-A, y el alquílico, NO<sub>2</sub>HTy-E, luego el tipo de unión de dicha cadena al compuesto NO<sub>2</sub>HTy no influye en su biodisponibilidad. Previamente, se había caracterizado con este mismo modelo celular, Caco-2, la biodisponibilidad y transporte del HTy y HTy-A (Mateos y cols., 2011) y otros derivados sintéticos alquílicos; metil, etil, *n*-propil y *n*-butil hidroxitirosil éter (Pereira-Caro y cols., 2010a), para conocer tanto la influencia de las distintas estructuras químicas como la naturaleza lipofílica de los compuestos sobre la transferencia a través de las monocapas de células Caco-2. Por una parte, el HTy muestra el mismo coeficiente de absorción que el NO<sub>2</sub>HTy, indicando que el grupo funcional nitro no modifica la biodisponibilidad a nivel intestinal. Por otro lado, los derivados lipofílicos de HTy también resultaron ser más biodisponibles que el propio HTy y no hubo diferencias entre el derivado acílico o alquílico con igual tamaño de la

cadena lateral, de acuerdo a lo descrito para la serie de los nitroderivados de HTy.

En línea con estos resultados, Tammela y cols., (2004) han observado que la longitud de la cadena alquílica afecta considerablemente la permeabilidad de los galatos de alquilo a través de la membrana de células Caco-2, de forma que los derivados con mayor naturaleza lipofílica, es decir, con una cadena alquílica más larga, fueron rápidamente absorbidos y metabolizados por las células. Existen más resultados en la literatura que refuerza ésta correspondencia o relación lineal entre absorción y lipofilia. Así, Werdenberg y cols., (2003) han constatado que la absorción de ésteres de ácido fumárico (metil, etil, *n*-propil y *n*-pentil) a través de la monocapa de células Caco-2 se ve incrementada a mayor longitud de la cadena lateral hidrocarbonada de la serie acílica.

Los metabolitos identificados para los compuestos nitroderivados tras la incubación con células Caco-2 son principalmente conjugados glucuronidados y en menor proporción derivados metilados y metilglucuronidados (Esquema 6.4). Cabe destacar que mientras el NO<sub>2</sub>HTy-E no sufre hidrólisis a NO<sub>2</sub>HTy, el derivado acetilado, NO<sub>2</sub>HTy-A, se hidroliza casi completamente generando el compuesto NO<sub>2</sub>HTy libre, y que subsiguientemente se metaboliza a derivados glucuronidados, metilados y metilglucuronidados. También se han identificado cantidades muy pequeñas del derivado glucuronidado del NO<sub>2</sub>HTy-A. Sin embargo, el NO<sub>2</sub>HTy-E se transforma en sus derivados glucuronidados y metilglucuronidados, proporcionando por tanto metabolitos más lipofílicos que aquellos derivados del metabolismo de los otros dos compuestos, NO<sub>2</sub>HTy y NO<sub>2</sub>HTy-A, lo que podría suponer dianas de actuación más lipofílicas. Un comportamiento equivalente se describió para los derivados lipofílicos del HTy, HTy-A y éteres alquílicos (Pereira-Caro y cols., 2010a; Mateos y cols., 2011).

Cabe destacar que el derivado alquílico, NO<sub>2</sub>HTy-E, es el compuesto que mayor contenido de derivados glucuronidados ha generado. Esto podría estar asociado a la ubicación de las enzimas de fase II. Así, La enzima UDP-glucuronil transferasa (UGTs), que cataliza la transferencia del ácido glucurónico desde UDP-ácido glucurónico (UDP-GA), pertenece a una familia de proteínas unidas

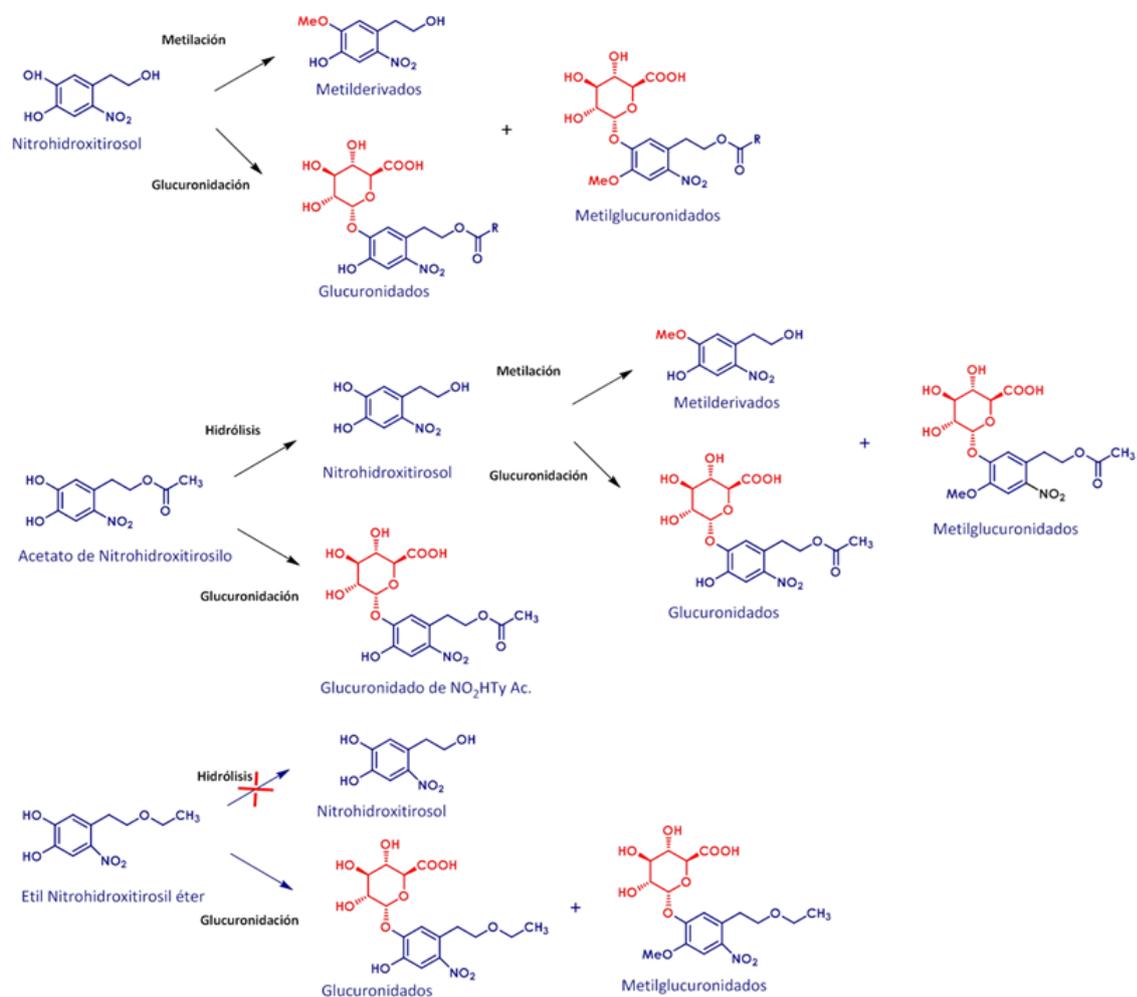
a la membrana, (Turkey y cols., 2000), de modo que la mayor naturaleza lipofílica del compuesto NO<sub>2</sub>HTy-E podría implicar una mayor afinidad y/o accesibilidad a dicha enzima. En contraste, la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT) es una enzima típicamente citosólica (Tenhunen y cols., 1994), lo que permitiría justificar el mayor rendimiento de formación de conjugados metilados a partir del compuesto más hidrofílico, NO<sub>2</sub>HTy, en comparación al más lipofílico (NO<sub>2</sub>HTy-E).

Por otro lado, no se identificaron conjugados sulfatados tras la incubación de los nitrocatecoles con células Caco-2. Existen evidencias de que las enzimas sulfotransferasas (SULT1 y SULT2), responsables de la sulfatación de ciertos compuestos fenólicos, se expresan en este modelo celular (Chen y cols., 2008; Meinel y cols., 2008). Así, se ha descrito un alto rendimiento de sulfatación de los compuestos genisteína, kaempferol, galangina y resveratrol tras su exposición a células Caco-2 (Kaldas y cols., 2003; Chen y cols., 2008; Barrington y cols., 2009). Los antecedentes descritos para el metabolismo de los fenoles del aceite de oliva en este mismo modelo celular ha mostrado nulo (Mateos y cols., 2011) o mínimo rendimiento de formación de derivados sulfatados en condiciones extremas de incubación y concentración (6h y 100  $\mu$ M) (Soler y cols., 2010).

Por último, cabe destacar que parte de los compuestos absorbidos y transportados a través de la monocapa celular permanecen sin metabolizar al cabo de las dos horas de incubación (81%, 17%, 33% correspondiente a NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E, respectivamente), sugiriendo su tránsito al torrente sanguíneo y posterior metabolización por otros órganos, como por ejemplo el hígado, principal órgano implicado en el metabolismo de xenobióticos. Aunque *a priori* pudiera parecer que casi todo el NO<sub>2</sub>HTy-A que se absorbe es metabolizado, la realidad es que el compuesto NO<sub>2</sub>HTy, resultado de la hidrólisis de NO<sub>2</sub>HTy-A, copa la mayor parte de los compuestos identificados en el compartimento basolateral. Al no tratarse el compuesto NO<sub>2</sub>HTy de un metabolito derivado de la acción de las enzimas de fase II, si se computa junto al restante NO<sub>2</sub>HTy-A, la fracción de compuesto absorbido que permanece sin metabolizar para el caso de NO<sub>2</sub>HTy-A ascendería a un 71%. Si comparamos el mayor índice de absorción del compuesto acetilado, NO<sub>2</sub>HTy-

## 6. Discusión

A, que el de su precursor, NO<sub>2</sub>HTy, estos resultados muestran una interesante y accesible vía de mejora de la biodisponibilidad del NO<sub>2</sub>HTy, mediante su transformación en el derivado acetilado.



**Esquema 6.4**

Rutas metabólicas de los compuestos nitroderivados (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) a su paso por el epitelio intestinal

En resumen, estos datos sugieren que los nitroderivados de HTy presentan una alta biodisponibilidad a nivel intestinal, proporcional a la naturaleza lipofílica del compuesto. Gran parte de los compuestos absorbidos permanecieron sin metabolizar por lo que podrían pasar al torrente sanguíneo y otros órganos como el hígado.

### 6.3.2. Biodisponibilidad y metabolismo a nivel hepático

Se ha estudiado el metabolismo de los nitroderivados de HTy en un sistema modelo *in vitro* con células de hepatoma humano, HepG2, por el interés que suscita el porcentaje de compuesto tan significativo que se absorbe a través del epitelio intestinal y permanece sin metabolizar.

Los resultados obtenidos permiten confirmar que los nitroderivados de HTy se absorben y metabolizan casi completamente, de forma directa al tiempo de incubación y la naturaleza lipofílica del compuesto.

El gran rendimiento metabólico de las células hepáticas HepG2 en contacto con los nitroderivados de HTy apoya la idea de que la mayor parte de las reacciones de conjugación tienen lugar principalmente en el hígado (D'Archivio y cols., 2010). De nuevo, los derivados glucuronidados, seguido de metilglucuronidados y en menor medida, conjugados metilados, fueron los compuestos identificados derivados del metabolismo de los nitrocatecoles por acción de las células HepG2, mientras que no se detectaron metabolitos sulfatados para ninguno de los compuestos estudiados.

Al igual que ocurría a nivel intestinal, los compuestos más lipofílicos NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E muestran una ruta de biotransformación diferente. Así, NO<sub>2</sub>HTy-E no se hidroliza a NO<sub>2</sub>HTy como le ocurre al análogo lipofílico, NO<sub>2</sub>HTy-A, sino que una vez absorbido se transforma en sus derivados glucuronidados y metilglucuronidados, proporcionando metabolitos más lipofílicos que aquellos generados del metabolismo de los compuestos NO<sub>2</sub>HTy y NO<sub>2</sub>HTy-A. La diferente naturaleza lipofílica de los metabolitos podría implicar dianas moleculares de acción diferentes.

La naturaleza hidrofílica y/o lipofílica del compuesto también ha determinado la proporción de metabolitos generados, destacando el mayor contenido de derivados glucuronidados a partir de NO<sub>2</sub>HTy-E y de metilados a partir de NO<sub>2</sub>HTy, cuya justificación podría radicar en la ubicación de las enzimas de fase II implicadas, ya comentado anteriormente.

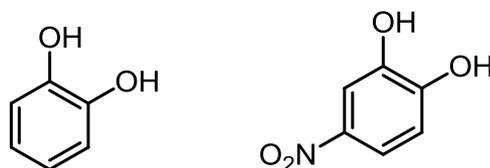
Estos resultados sobre la biodisponibilidad de los nitroderivados en una línea celular de hepatoma humano, HepG2, están de acuerdo a aquellos descritos para el HTy y sus derivados lipofílicos (acílicos y alquílicos) (Mateos y cols., 2005; Pereira-Caro y cols., 2010b) que detallan un alto rendimiento metabólico de todos los compuestos, ausencia de hidrólisis de los derivados alquílicos frente a los acílicos y formación de derivados conjugados propios de las enzimas de fase II, excepto el derivado sulfatado.

La metabolización tan extensa descrita para los nitroderivados de HTy, aparte de estar de acuerdo con numerosos antecedentes publicados para los fenoles del aceite de oliva y otros flavonoides, plantea la controversia sobre la identidad del compuesto bioactivo, el compuesto parental o sus metabolitos derivados, puesto que es previsible que la biotransformación sufrida pueda afectar profundamente la actividad biológica (Day y cols., 2000; Wen y cols., 2006). Se ha valorado comparativamente la actividad antioxidante *in vitro* del HTy y sus principales metabolitos para proteger los glóbulos rojos frente a la oxidación (Paiva-Martins y cols., 2013). Los resultados evidenciaron una mayor actividad para el HTy en comparación con el derivado glucuronidado, el cual mostró una actividad limitada frente a la prevención de la hemólisis de los glóbulos rojos. Igualmente, numerosas evidencias *in vitro* han descrito una mayor actividad biológica para la quercetina que su derivado glucuronidado, el derivado más abundante en sangre (Revisado en Perez-Vizcaíno y cols., 2012). Aunque los resultados *in vitro* a veces distan de lo que realmente ocurre *in vivo*, se han postulado mecanismos de desconjugación *in vivo* que podrían justificar el efecto biológico asignado a ciertos polifenoles (Menéndez y cols., 2011, Tomás-Barberán y Andrés-Lacueva, 2012). Así, recientemente se ha descrito una disminución de las formas conjugadas del HTy en paralelo al aumento del propio HTy en los glóbulos rojos hasta las seis horas de la ingesta de un extracto rico en fenoles del alperujo por ratas, sugiriendo una hidrólisis intracelular a la forma desconjugada (Rubio y cols., 2014). De la misma manera, Perez-Vizcaíno y cols., (2012) han propuesto que el proceso de conjugación-desconjugación es un ciclo reversible, que permite justificar la hidrólisis del glucuronidado de la quercetina y formación de la forma libre o aglicón, el compuesto activo y con actividad vasodilatadora e hipertensiva, facilitando así su acumulación en los tejidos.

En resumen, los nitroderivados de HTy se absorben y metabolizan en gran extensión, mostrando una relación directa con el carácter lipofílico del compuesto. La diferente naturaleza química del enlace éster y éter del NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E, respectivamente, determina la diferente naturaleza lipofílica de los metabolitos, diferentes dianas moleculares y por tanto de interés a la hora de elegir uno sobre otro en su uso como ingrediente funcional y/o nutracéutico.

#### 6.4. Evaluación de la capacidad antioxidante y neuroprotectora de NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E en modelos experimentales de daño cerebral

Siendo el propósito inicial de esta tesis la obtención de derivados sintéticos de HTy con analogía estructural a los actuales inhibidores de la enzima COMT, fue considerado de interés estudiar la relación entre la estructura nitrocatecol y la actividad antioxidante así como neuroprotectora, ya conocida y ampliamente demostrada en sus precursores con estructura catecol (Figura 6.2). Si bien en la presente Memoria ya ha sido descrita la actividad antioxidante mostrada por los nitrocatecoles de HTy (ver apartado 5.2), hay que recordar que la información que suministran los métodos químicos para evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de los compuestos puros, no es completamente extrapolable a las condiciones fisiológicas. Por ello, los resultados obtenidos anteriores pueden distar de aquellos que se obtengan en un medio biológico *in vitro* o bien, modelos *in vivo* o *ex vivo*, por la complejidad que estos sistemas implican.



**Figura 6.2**  
Estructuras catecol y nitrocatecol, respectivamente

#### 6.4.1. Valoración del efecto antioxidante en tejido cerebral

El estudio del estrés oxidativo tisular lo planteamos en tres situaciones experimentales diferentes: tejido cerebral sin inducción oxidativa (condiciones basales), tejido sometido a un estrés oxidativo de tipo químico y tejido sometido a un estrés oxidativo mediado por un proceso de hipoxia-reoxigenación (HR). En el primer caso, se estudia el posible efecto de estos compuestos sobre el estatus oxidativo (equilibrio fisiológico entre factores oxidantes y antioxidantes celulares). En el segundo, se analiza la capacidad de los mismos sobre un tejido en el que se han estimulado químicamente mecanismos oxidativos (inducción con FeAs y *t*-BOOH) o se ha frenado la capacidad antioxidante celular (incubación con DEM). En el tercer caso, la estimulación del estrés oxidativo tisular se realiza mediante el proceso experimental de HR, el cual produce un daño tisular mediatizado no solo por una inducción del citado estrés oxidativo, sino por otras vías que están relacionadas y que simulan lo acontecido en un cerebro que ha sufrido un ictus isquémico (Lopez-Villodres y cols., 2012; Sahota y cols., 2011).

En primer lugar se determinaron los posibles efectos antioxidantes de los compuestos estudiados en **cortes de cerebro sin el estímulo del estrés oxidativo**, para ello se mantuvieron oxigenados durante todo el tiempo experimental. En estas condiciones, ninguno de los compuestos utilizados modificó significativamente, en un rango de concentración aceptable ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M), la peroxidación lipídica como parámetro representativo de estrés oxidativo.

Este comportamiento es coherente con el de la mayoría de los compuestos antioxidantes, que ejercen su efecto sólo en situaciones de estrés oxidativo y no muestran ningún efecto en las situaciones de equilibrio bioquímico. La ausencia de efecto sobre el estado oxidativo celular es relevante porque demuestra que estos compuestos no alteran el equilibrio redox celular fisiológico sea cual sea la estructura química fundamental de los mismos.

En segundo lugar, se valoró el potencial efecto antioxidante de estos compuestos en una **situación de inducción química del estrés oxidativo en el tejido cerebral oxigenado**. La peroxidación lipídica fue inducida con sales ferrosas, la formación de radicales libres intracelulares con *t*-BOOH y la inhibición del sistema del glutatión con maleato de dietilo (DEM). Tras la aplicación de los diferentes modelos, se obtuvo un aumento del estado oxidativo y una disminución de los niveles de glutatión en muestras basales.

El MDA es uno de los principales productos de la oxidación lipídica (Breusing y cols., 2010). Desde que el MDA fue detectado en niveles altos en diferentes enfermedades relacionadas con el daño oxidativo, su uso se ha extendido como índice de lipoperoxidación (Suttnar y cols., 2001). Si comparamos la potencia antiperoxidativa de los compuestos estudiados mediante el parámetro estandarizado IC<sub>50</sub>, que expresa la concentración de un compuesto para inhibir un 50% el efecto evaluado (Tabla 6.7), podemos observar que ambas series de compuestos redujeron los niveles de MDA, especialmente los derivados lipofílicos (serie acílica y alquílica) respecto a sus correspondientes precursores en ambas series de compuestos. Sin embargo, si comparamos ambas series observamos que la actividad de los nitrocatecoles resultó ser ligeramente menor que los compuestos de la serie catecol. Los nitrocatecoles mostraron una actividad antiperoxidativa acorde a resultados previamente obtenidos en una línea celular de hepatoma humano tras la inducción del daño oxidativo con *t*-BOOH (Sarriá y cols., 2012), que demuestran un efecto antioxidante para los tres compuestos.

**Tabla 6.7**

Valores de IC<sub>50</sub> (μM) como medida de la potencia antiperoxidativa de los compuestos de la serie nitrocatecol y catecol

	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E	HTy	HTy-A	HTy-E
<b>TBARS-FeAs</b>	35,30	9,64	5,81	11,35	6,78	3,88

NO<sub>2</sub>HTy: Nitrohidroxitirosol. NO<sub>2</sub>HTy-A: Acetato de nitrohidroxitirosol. NO<sub>2</sub>HTy-E: Éter etílico de nitrohidroxitirosol. HTy: Hidroxitirosol. HTy-A: Acetato de hidroxitirosilo. HTy-E: Eter etílico de hidroxitirosilo. FeAs: Sulfato ferroso + Ácido ascórbico.

Nuestros resultados sin embargo destacan al derivado alquílico como el compuesto con mayor potencia antiperoxidativa, hecho que coincide también en la serie catecol. De esta forma el orden de actividad en ambas series sería el siguiente: derivado alquílico > derivado acílico > HTy/NO<sub>2</sub>HTy.

En un segundo estudio, fue cuantificado el contenido intracelular de EROs (Tabla 6.8) para evaluar la capacidad de los compuestos estudiados de secuestro de especies reactivas de oxígeno (EROs).

**Tabla 6.8**  
Valores de IC<sub>50</sub> (μM) como medida de la capacidad de secuestro de radicales libres de los compuestos de la serie nitrocatecol y catecol

	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E	HTy	HTy-A	HTy-E
<b>EROS-<i>t</i>-BOOH</b>	>500	12,90	8,67	8,92	9,71	13,83

NO<sub>2</sub>HTy: Nitrohidroxitirosol. NO<sub>2</sub>HTy-A: Acetato de nitrohidroxitirosol. NO<sub>2</sub>HTy-E: Éter etílico de nitrohidroxitirosilo. HTy: Hidroxitirosol. HTy-A: Acetato de hidroxitirosilo. HTy-E: Eter etílico de hidroxitirosilo. *t*-BOOH: *tert*-butilhidroperóxido

Los resultados muestran una destacable capacidad de secuestro de EROs para la serie catecol con valores de IC<sub>50</sub> en un rango de concentraciones de [8-14] μM. Por el contrario, en la serie nitrocatecol, sólo los derivados lipofílicos mostraron una capacidad antioxidante significativa. Estos resultados evidencian la falta de potencia antioxidante de NO<sub>2</sub>HTy en un modelo cerebral de inducción química con *t*-BOOH. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que han demostrado recientemente que el pretratamiento de células HepG2 con NO<sub>2</sub>HTy no previene el daño oxidativo con *t*-BOOH a diferencia de los derivados lipofílicos de NO<sub>2</sub>HTy que sí lograron prevenir el daño oxidativo, y en particular el NO<sub>2</sub>HTy-A recuperó los niveles basales (Sarría y cols., 2012).

En un análisis del sistema de defensa endógeno glutatión, respecto a la concentración de GSH en cortes cerebrales oxigenados en los que se ha disminuido el contenido de glutatión mediante DEM, podemos concluir que ninguno de los compuestos ensayados fue capaz de aumentar la concentración de GSH de forma significativa. Estos resultados difieren de aquellos obtenidos por Sarría y cols., (2012) que demuestran que el pretratamiento con los nitroderivados de HTy en un modelo de inducción con

*t*-BOOH en células HepG2, aumentó los niveles intracelulares de GSH hasta recuperar los valores basales en el caso del derivado alquílico. Sin embargo, nuestros resultados sí coinciden con otros estudios previos en tejido cerebral de rata en un modelo de inducción con DEM, en los que los principales polifenoles del aceite de oliva virgen modifican escasamente el sistema del glutatión, centrando su principal efecto antioxidante en la inhibición de la peroxidación lipídica tisular (Gonzalez-Correa y cols., 2007; Cabrerizo y cols., 2013).

En general, nuestros resultados muestran que la presencia del grupo catecol y nitrocatecol justifica el efecto antiperoxidativo lipídico y de secuestro de EROs en el tejido cerebral, sin embargo ello no parece estar condicionado por un posible estímulo del sistema antioxidante endógeno del glutatión.

En tercer lugar, realizamos **experimentos en los que se indujo el estrés oxidativo en un modelo de HR en cortes de cerebro de rata**. En este modelo se observó un aumento de la peroxidación lipídica y una disminución de los niveles de glutatión respecto al tejido basal. La importancia de este modelo es que el estrés oxidativo no se induce externamente con un producto químico, sino que es el resultado de la activación o la inhibición de diferentes vías bioquímicas intracelulares que se alteran tras la privación de oxígeno y de glucosa y la reoxigenación posterior. Este proceso trata de reproducir *in vitro* las alteraciones producidas durante el ictus isquémico en humanos (Sahota y cols., 2011).

Utilizando como base los resultados de IC<sub>50</sub> antiperoxidativa de estos compuestos en los experimentos de inducción con sales ferrosas, en la tabla 6.9 representamos, a modo comparativo, los valores obtenidos en el modelo de hipoxia-reoxigenación:

**Tabla 6.9**

Valores de IC<sub>50</sub> (μM) como medida de la potencia antiperoxidativa de los compuestos de la serie nitrocatecol y catecol tras los modelos de inducción química e HR

	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E	HTy	HTy-A	HTy-E
<b>TBARS-FeAs</b>	35,30	9,64	5,81	11,35	6,78	3,88
<b>TBARS-HR</b>	>500	>500	>500	52,41	6,60	76,03

HR: hipoxia-reoxigenación. FeAs: Sulfato ferroso + Ácido ascórbico NO<sub>2</sub>HTy: Nitrohidroxitirosol.  
 NO<sub>2</sub>HTy-A: Acetato de nitrohidroxitirosilo. NO<sub>2</sub>HTy-E: Éter etílico de nitrohidroxitirosilo.  
 HTy: Hidroxitirosol. HTy-A: Acetato de hidroxitirosilo. HTy-E: Eter etílico de hidroxitirosilo

Los compuestos catecoles presentaron mayor actividad antioxiante que los nitrocatecoles, siendo el derivado acílico el más activo de todos como lo demuestra su valor de IC<sub>50</sub> tan pequeño (6,60 μM).

La pérdida de eficacia en la inhibición de la peroxidación lipídica de los compuestos estudiados en un modelo de HR, fundamentalmente en los nitrocatecoles, es razonable pensar que estos compuestos ejercen su acción a través de una vía diferente a la que se presenta tras la privación completa de oxígeno al cerebro. Aunque está descrito que tras la isquemia tisular se generan multitud de EROs responsables del daño tisular (Sanderson y cols., 2013), los desencadenantes en el modelo de HR no es otro que la privación de oxígeno y el desbalance iónico inducido. Por el contrario, en el modelo de inducción química el inductor y generador de radicales libres es el hierro. Esto nos lleva a plantear que la vía de actuación de los compuestos nitroderivados sea principalmente aquella referida a su acción quelante de este elemento metálico.

Un aspecto importante en el mantenimiento de un estado oxidativo tisular es el comportamiento del sistema del glutatión. En el modelo de HR, valores basales indican, paralelamente a un incremento de la peroxidación lipídica cerebral, un descenso en un 48,5% del contenido de glutatión reducido (GSH), así como un incremento de un 37,4% en el porcentaje de glutatión que se encuentra en forma oxidada (GSSG). Es decir, existe un daño oxidativo que consume glutatión en un intento de compensarlo. Estos resultados reproducen estudios anteriores con este mismo modelo (González-Correa y cols., 2007; Guerrero y cols., 2012).

En términos generales, la concentración de 100  $\mu\text{M}$  no moduló los niveles de GSH y GSSH para los nitrocatecoles pero sí para los catecoles estudiados. La ausencia de efecto directo de los compuestos nitroderivados ( $\text{NO}_2\text{HTy}$ ,  $\text{NO}_2\text{HTy-A}$  y  $\text{NO}_2\text{HTy-E}$ ) sobre el sistema del glutatión en cualquiera de los modelos estudiados, químico e isquemia-reperfusión, evidencia la menor influencia de estos compuestos sobre otros mecanismos antioxidantes diferentes a los ya mencionados anteriormente. Por el contrario, los catecoles estudiados ( $\text{HTy}$ ,  $\text{HTy-A}$  y  $\text{HTy-E}$ ) no habiendo presentado efecto sobre el sistema glutatión en los experimentos sin inducción como en los de inducción química, requirieron un proceso de estimulación de estrés oxidativo más complejo, como es el caso de la HR, para poder demostrar dicha actividad antioxidante. Además, estos datos con derivados de HTy coinciden con resultados de estudios anteriores a través del empleo del mismo modelo experimental (González-Correa y cols., 2008; Cabrerizo y cols., 2013; Guerrero y cols., 2012).

Por lo tanto, si contemplamos los resultados de estrés oxidativo cerebral en su conjunto, podemos aseverar que la presencia del grupo nitro en la estructura catecol parece relevante para explicar el efecto antioxidante de los compuestos nitroderivados de HTy en modelos de inducción química. Posiblemente el efecto antiperoxidativo sea mayor que el efecto mostrado como secuestradores de EROs debido a la estabilidad originada en la estructura nitrocatecol en su unión al hierro.

#### **6.4.2. Estudio del efecto neuroprotector**

El estrés oxidativo (desequilibrio entre producción de radicales libres y defensa antioxidante tisular) juega un papel fundamental en el proceso de muerte neuronal en la isquemia cerebral. Este hecho ha sido la base para postular la posible utilización de compuestos antioxidantes en la prevención del daño celular postisquémico cerebral (Albarracín y cols., 2012; Chen y cols., 2011; Kamat y cols., 2008). En base a esto, nosotros planteamos ahondar en la relación entre el efecto antioxidante de la estructura nitrocatecol y su posible efecto neuroprotector, el cual ya ha sido demostrado para los catecoles también estudiados (González-Correa y cols., 2008; Schaffer y cols., 2007),  $\text{HTy-E}$

(Guerrero y cols., 2012; Muñoz-Marín y cols., 2012) y HTy-A (González-Correa y cols., 2008). En este apartado nos interesa poner de relieve si el efecto antioxidante de los nitroderivados de HTy, diseñados con aplicabilidad en el tratamiento de la EP, podría explicar su efecto neuroprotector estrechamente ligado al desbalance oxidativo que subyace a esta enfermedad. Es necesario recordar que el efecto neuroprotector se evaluó tras la aplicación de un modelo de daño neuronal basado en la isquemia-reperfusión.

**Tabla 6.10**

Valores de IC<sub>50</sub> (μM) como medida de la capacidad neuroprotectora en relación con la potencia antiperoxidativa de los compuestos de la serie nitrocatecol y catecol

	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E	HTy	HTy-A	HTy-E
<b>TBARS-FeAs</b>	35,30	9,64	5,81	11,35	6,78	3,88
<b>TBARS-HR</b>	>500	>500	>500	52,41	6,60	76,03
<b>LDH</b>	>500	>500	>500	165,00	13,36	28,10

HR: hipoxia-reoxigenación. FeAs: Sulfato ferroso + Ácido ascórbico NO<sub>2</sub>HTy: Nitrohidroxitirosol.

NO<sub>2</sub>HTy-A: Acetato de nitrohidroxitirosol. NO<sub>2</sub>HTy-E: Éter etílico de nitrohidroxitirosilo.

HTy: Hidroxitirosol. HTy-A: Acetato de hidroxitirosilo. HTy-E: Éter etílico de hidroxitirosilo

El análisis de estos resultados, a fin de correlacionar potencia antioxidante y neuroprotectora (Tabla 6.10), evidencia que las concentraciones evaluadas de los compuestos de la serie nitrocatecol (NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E) no fueron capaces de compensar el daño oxidativo inducido por hipoxia. De forma contraria, la actividad neuroprotectora ejercida por los catecoles (HTy, HTy-A y HTy-E) señala a su potencia antioxidante como la responsable de su actividad frente al daño del tejido cerebral, con independencia de que cursen otras vías de actuación frente al daño cerebral durante el proceso de HR y que podría explicar el efecto global neuroprotector descrito para los polifenoles del aceite de oliva virgen (Cabrerizo y cols., 2013; González-Correa y cols., 2008; Muñoz-Marín y cols., 2012; Schaffer y cols., 2007).

La falta de un claro efecto neuroprotector en los nitrocatecoles, bajo el prisma del modelo experimental utilizado, justificó que no se abordara el estudio de las vías bioquímicas implicadas en el daño cerebral. Además, los resultados obtenidos en los experimentos *ex vivo*, es decir, tras la administración oral de estos compuestos, corroboraron los obtenidos en los experimentos *in vitro*.

A pesar de la alta actividad antioxidante de los compuestos nitrocatecoles y que el estrés oxidativo protagoniza el daño en el modelo de HR, no fue suficiente como para mejorar el estatus antioxidante del tejido cerebral tratado con estos compuestos y por tanto mostrar un efecto neuroprotector. No obstante, este estudio no puede descartar la participación de estos compuestos en otras vías implicadas en el daño cerebral.

Así, en la enfermedad de parkinson se postula que sustancias que posean efecto quelante sobre el hierro constituye una vía de actuación frente el estrés oxidativo presente en la etiopatogenia de esta enfermedad (Mariani y cols., 2005; Hayashi y cols., 2012; Friedman y cols., 2012). Si bien es conocido que el hierro es inductor de la formación de peróxidos lipídicos. Estudios centrados en la estructura catecol han puesto de manifiesto desde hace años la importancia de los grupos hidroxilos del anillo aromático para quelar el hierro formando así complejos catecol-hierro (Kawabata y cols., 1996). Aunque poco se conoce sobre la posible influencia del grupo nitro en la estructura catecol, sí es cierto que este grupo electronegativo otorga un marcado carácter electroatrayente en el entorno de la molécula, pudiendo proporcionar una mayor estabilidad a la estructura. En comparación con la estructura catecol, se ha descrito que estos compuestos nitroderivados presentan mayor carácter ácido lo que lo hace menos susceptible a la oxidación (Cornard y cols., 2005). Esto podría justificar los resultados de la actividad antioxidante de los nitrocatecoles de HTy en relación a su papel como quelantes del hierro. La literatura basada en el empleo de diversos inhibidores de la COMT, extiende sus estudios al uso de estos compuestos como agentes quelantes de hierro. Así, Kawabata y cols., 1996 demostraron que los complejos formados por nitecapona y entacapona – Fe(III) presentaban una unión fuerte en la que el hierro quelado podría ser más difícil de reducir que el de la propia unidad catecol. De igual forma, se ha postulado una alta eficacia en la capacidad de secuestro de hierro quelado a través de la estructura nitrocatecol permitiendo la formación de hasta un máximo de 5 sólidos complejos nitrocatecol-Fe(III) según la posición del grupo nitro en el anillo aromático (Gavazov y cols., 2012).

Llegados a este punto, es importante recordar que el objetivo principal del presente trabajo era evaluar el papel de los compuestos nitrocatecoles sobre la acción de la enzima COMT, directamente relacionada con el metabolismo de la dopamina y, por tanto, íntimamente implicada en la EP. Por tanto, los resultados presentados demuestran un efecto antioxidante de los compuestos nitrocatecoles en sistemas biológicos y que puede suponer un efecto coadyuvante en relación con la inhibición de la COMT (Kawabata y cols., 1997; Gavazov y cols., 2012), ampliando el posible mecanismo de acción en un potencial efecto terapéutico en dicha enfermedad.

### 6.5. Estudio del efecto de los nitroderivados de HTy sobre la actividad COMT

Inicialmente, los nitroderivados de HTy fueron propuestos como agentes con potencial terapéutico frente a la EP, por su analogía estructural a los inhibidores de la enzima COMT. Ahora estos estudios se integran en un marco mayor, en el cual, se propone una doble función de los compuestos nitrocatecoles en relación a la EP. Por una parte, se han abordado estudios que correlacionan la actividad antioxidante, fundamentalmente su acción como agentes quelantes de hierro y la etiopatogenia de la EP (ver apartado 6.4). Por otro lado, dada la analogía estructural anteriormente citada, se amplía la investigación hacia la propuesta de unos compuestos capaces de inhibir la COMT y modular el metabolismo de DA. Esta propuesta surge debido al gran interés en las últimas décadas por diseñar nuevos orto-nitrocatecoles que mejoren la baja biodisponibilidad y relativa vida media que caracteriza a los inhibidores de la COMT empleados en la clínica (Keranen y cols., 1994; Dingemanse y cols., 1995). Por ello, ha suscitado mucho interés para su investigación el desarrollo de inhibidores potentes de larga duración que puedan ser empleados de forma concomitante en la terapia con L-dopa y la enzima AAD de acción periférica para el tratamiento de la EP (Learmonth y cols., 2002; Learmonth y cols., 2004). Así, proponemos a los nuevos inhibidores potenciales de la COMT, derivados de HTy, de carácter lipofílico, a fin de evaluar su capacidad para atravesar la BHE y, por consiguiente, demostrar sus efectos sobre neuromarcadores de la EP en el tejido estriado de rata.

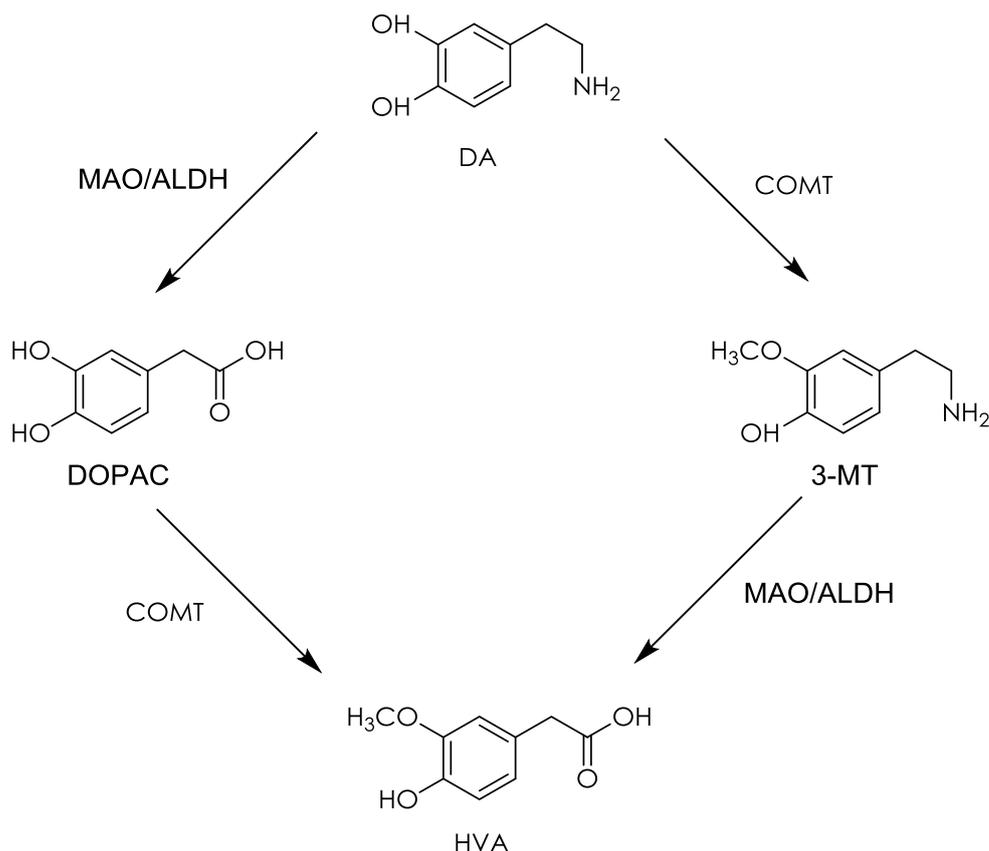
En este apartado valoraremos la actividad de estos compuestos sobre el metabolismo de la DA. Para ello, se han abordado dos tipos de estudios: uno primero consistente en estudios *ex vivo* a fin de conocer el potencial de los compuestos en el sistema nervioso central tras una administración intraperitoneal y su paso por la BHE. El segundo basado en estudios *in vivo* por microdialísis, con el objetivo de valorar de forma local, en el cerebro, las variaciones en el metabolismo de DA tras someter al animal a la perfusión intracerebral de los distintos compuestos.

### **6.5.1. Estudios en tejido**

Estos estudios se acometieron con el objetivo de valorar la potencia de estos compuestos sobre la actividad COMT y la posible influencia de la naturaleza lipofílica de las moléculas en dicho efecto.

#### *6.5.1.1. Efecto sobre la DA y sus metabolitos*

Se conoce que un inhibidor de la COMT debe incrementar la cantidad de DA presente en el cerebro porque reduce su catabolismo y, al mismo tiempo, incrementa los niveles de DOPAC, el cual, se produce a partir de la DA, por acción de la MAO (figura 6.3).

**Figura 6.3**

Metabolismo de la dopamina.

La dopamina (DA) puede degradarse por acción de las enzimas catecol-O-metiltransferasa (COMT), aldehído deshidrogenasa (ALDH) y monoamina oxidasa (MAO). Otras abreviaciones: ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) y 3-metoxitiramina (3-MT).

Atendiendo al esquema anterior, se encontró que, en los animales tratados con NO<sub>2</sub>HTy y su precursor, HTy, hubo una fuerte inhibición de la enzima COMT, según indican los valores de DA y DOPAC, tras un tratamiento crónico (Tabla 6.11).

**Tabla 6.11**

Porcentaje del aumento de los niveles DOPAC y DA respecto a valores basales (100%) tras el tratamiento crónico

	Ro 41-0960	HTy	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E
<b>% DOPAC</b>	225,5	155,1	167,6	181,7	195,8
<b>% DA</b>	122,4	137,0	113,7	114,3	123,6

DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacético. DA: Dopamina. Ro 41-0960: Inhibidor comercial. 2: Hidroxitirosol. 49: Nitrohidroxitirosol. 50: Acetato de nitrohidroxitirosilo. 59: Éter etílico de nitrohidroxitirosilo

También, en un análisis comparativo de NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E pudimos observar diferencias mayores en los niveles intracelulares de DOPAC, lo que demuestra que estos derivados lipofílicos poseen una actividad superior a la manifestada por NO<sub>2</sub>HTy y su precursor natural, HTy (Tabla 6.11). En este sentido, es razonable pensar que la naturaleza química de la cadena lateral pueda influir en la actividad estudiada. Estudios REA han demostrado que, aunque la estructura nitrocatecol es la principal responsable del anclaje del inhibidor al sitio activo de la enzima, variaciones en la cadena lateral ejercen una profunda influencia en la selectividad periférica y duración de la inhibición sobre la actividad COMT (Bonifacio y cols., 2007). Además, si atendemos al objetivo de sintetizar derivados lipofílicos, podemos mencionar la relación existente entre biodisponibilidad y la potencia en la eficacia clínica. Hasta el momento, la bibliografía describe que entacapona sigue siendo, sin restricciones especiales, el inhibidor de la COMT más usado en la práctica clínica. Sin embargo, se ha descrito una biodisponibilidad oral limitada (aproximadamente del 35%), lo cual explica la corta vida media de este compuesto (Bonifacio y cols., 2007). Estos resultados demuestran que los actuales inhibidores usados en clínica se metabolizan rápidamente en su paso por el intestino. Por el contrario, en la presente tesis se ha descrito que gran parte de lo que se absorbe a nivel intestinal permanece sin metabolizar (ver apartado 6.3), lo cual facilita una mayor biodisponibilidad de los mismos.

**Tabla 6.12**

Porcentaje de la disminución de los niveles de HVA respecto a valores basales (100%) tras el tratamiento crónico

	<b>Ro 41-0960</b>	<b>HTy</b>	<b>NO<sub>2</sub>HTy</b>	<b>NO<sub>2</sub>HTy-A</b>	<b>NO<sub>2</sub>HTy-E</b>
<b>% HVA</b>	13,1	102,5	95,7	83,8	86,5

HVA: Ácido homovanílico. Ro 41-0960: Inhibidor comercial. 2: Hidroxitirosol.  
49: Nitrohidroxitirosol. 50: Acetato de nitrohidroxitirosilo.  
59: Éter etílico de nitrohidroxitirosilo

Respecto al HVA, se observó, de forma contraria a lo esperado, un aumento de sus niveles intracelulares tras la administración de HTy (Tabla 6.12). En relación con estos resultados, Caruso y cols. (2001) describieron que el metabolismo de HTy incrementa la excreción urinaria de HVA como metabolito derivado del mismo. Estudios recientes han demostrado que HTy es metabolizado a HVAL por acción de la actividad COMT (Gallardo y cols.,

2014), el cual es, subsecuentemente, convertido a HVA (De la Torre, 2008). Por el contrario, los nitroderivados de HTy, debido a su estructura nitrocatecol, no producen HVAL como metabolito resultante de la actividad COMT. Estos datos indican una metabolización diferente de los nitroderivados, lo cual, ya no produce un aumento de HVA, sino una disminución de sus valores, como es de esperar por inhibición de la COMT, aunque no de forma tan significativa como ocurre con Ro 41-0960.

### 6.5.1.2. Comparación de los tratamientos agudo y crónico

Es importante destacar que el inhibidor comercial empleado en nuestros estudios, Ro 41-0960, a diferencia del resto de compuestos ensayados, presentó valores similares en el contenido estriado de DA y DOPAC cuando se administró de forma aguda y crónica, sugiriendo una elevada potencia de dicho compuesto, sin necesidad de alcanzar altas dosis en el cuerpo estriado para ejercer su efecto. Además, en un estudio comparativo del tratamiento crónico, el inhibidor comercial Ro 41-0960 mostró un notable aumento de los valores de DOPAC frente al resto de compuestos ensayados. Los resultados vislumbran claras diferencias, en términos de potencia y efecto a causa de diferentes comportamientos farmacocinéticos. Así, los nitrocatecoles han sido caracterizados cinéticamente como inhibidores reversibles “de unión fuerte” de la actividad COMT (Borges y cols., 1997; Lotta y cols., 1995; Schultz y Nissinen, 1989). Por tanto, estos inhibidores se unen a la enzima con alta afinidad de forma que la cantidad de moléculas inhibitoras libres están significativamente reducidas debido a la formación del complejo enzima-inhibidor (Copeland, 2000).

Por otro lado, los resultados confirmaron un aumento significativo en el contenido de DA y DOPAC en el estriado observado por HTy y sus derivados, especialmente, los nitroderivados, tras un tratamiento crónico en comparación con una administración única. Estos resultados sugieren que los nuevos inhibidores de la COMT, administrados en el tejido periférico, pueden alcanzar el cerebro tras un tratamiento sistemático y, en menor medida, tras una única administración. En línea con estos resultados, Parada y cols. (2003) observaron que los niveles de DOPAC y HVA observados en el estriado no se vieron significativamente afectados tras una única dosis de Nebicapone. Por el

contrario, tras repetidas dosis del inhibidor, se observó un incremento de DOPAC y una disminución de HVA, indicando una posible inhibición de la COMT que acontece con altas dosis del inhibidor tras una administración sistémica.

En relación al contenido en el estriado de HVA, sólo Ro 41-0960 disminuyó de forma concomitante al aumento de los niveles de DA y DOPAC, como es de esperar tras la inhibición de la actividad COMT. Esta fuerte inhibición del catabolismo observado tras la administración sistémica de Ro 41-0960 sugiere que este compuesto es un potente inhibidor cuya actividad es similar a otros inhibidores ya descritos como es el Ro 40-7592 (Kaakkola y cols., 1992).

De cualquier forma, aunque la disminución de los valores de HVA fue comparativamente menor para los nuevos nitrocatecoles respecto al inhibidor comercial, sí fue estadísticamente significativa, sugiriendo que pueden ser inhibidores potenciales de la enzima COMT, con un aumento de los valores de DA y DOPAC, de forma concomitante a la disminución de HVA, tras una administración crónica de los compuestos.

### **6.5.2. Estudios en dializado: microdiálisis**

La razón primera que nos movió a utilizar esta metodología fue que una aplicación local, a nivel cerebral, de una determinada droga o compuesto con potencial farmacológico es muy interesante para conocer el comportamiento de los mismos sin interferencias a nivel sistémico. De esta forma, las variaciones en el metabolismo de DA son, claramente, más detectables, permitiéndonos inferir el tipo de actividad de los compuestos estudiados sobre el sistema nervioso central

La técnica de microdiálisis cerebral es considerada una herramienta complementaria en estudios de neurociencias, pero de especial relevancia por sus múltiples ventajas. Permite monitorizar concentraciones locales de drogas y sus metabolitos en sitios específicos del cerebro (Alavijeh y Palmer, 2010). En este sentido, la importancia de esta técnica reside en la utilidad de la perfusión de drogas a efectos de liberar neurotoxinas en áreas específicas del

cerebro y valorar cambios en los sistemas de neurotransmisores (Gainetdinov y cols., 1997; Santiago y cols., 2001). En otros estudios de microdialisis, se ha dedicado especial atención al transporte de drogas o compuestos bioactivos a través de la BHE (Palmer y Alavijeh, 2013). Así, se han abordado estudios farmacocinéticos monitorizando el paso de los compuestos a través de la misma mediante una administración intraperitoneal del compuesto y posterior detección en el dializado, poniendo así de manifiesto el carácter lipofílico de los compuestos estudiados (Kaddoumi y cols., 2003; De Lange y cols., 2005; Wu y cols., 2009). Finalmente, el verdadero interés de esta técnica *in vivo* reside en que es la única que ofrece la posibilidad de monitorizar el transporte de drogas a nivel cerebral en animales no anestesiados y con libertad de movimiento (Alavijeh y Palmer, 2010; Anderzhanova y Wotkak, 2013).

Por todo ello, considerando la utilidad de esta técnica como herramienta complementaria a otras metodologías, procedimos a evaluar el potencial de los compuestos ensayados sobre la actividad COMT y el metabolismo de DA de forma local en el cuerpo estriado del cerebro de rata.

### 6.5.2.1. Efecto sobre la DA y sus metabolitos

En un primer análisis de los niveles extracelulares de DOPAC, fue destacable la actividad mostrada por HTy con un incremento de sus niveles extracelulares estadísticamente superiores a los niveles basales e incluso superior al propio inhibidor comercial (Tabla 6.13). Aunque la literatura describe que en la segunda generación de inhibidores la potencia se mejora tras la incorporación de un grupo nitro (Bonifacio y cols., 2007), nuestros resultados muestran un aumento significativo para ambas series de compuestos, catecol y nitrocatecol. Este hecho, que coincide con los resultados obtenidos tras una administración intraperitoneal, pone de manifiesto, también, la influencia de la estructura catecol sobre la actividad COMT.

Numerosas investigaciones han centrado sus esfuerzos en hallar una posible relación e implicación de la estructura catecol en la EP. Fundamentalmente, se ha demostrado que su acción en esta patología

media a través de su actividad antioxidante gracias a su estructura *orto*-difenólica y su papel como agente secuestrador de hierro (Kawabata y cols., 1996; Orama y cols., 1997), elemento clave en la etiopatología de dicha enfermedad y que ha sido previamente comentada en el objetivo 4 del apartado de discusión. Sin embargo, nosotros hemos demostrado en este estudio que la perfusión intracerebral de este compuesto fenólico incrementa localmente los valores de DOPAC, prueba de su actividad central, lo que nos permite inferir su acción directa sobre la actividad de la COMT.

**Tabla 6.13**

Porcentaje del aumento de los niveles extracelulares de DOPAC respecto a valores basales (100%) tras los estudios de microdiálisis

	Ro 41-0960	HTy	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E
<b>% DOPAC</b>	136,0	143,5	125,0	125,0	128,0

DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacético. Ro 41-0960: Inhibidor comercial.  
 2: Hidroxitirosol. 49: Nitrohidroxitirosol. 50: Acetato de nitrohidroxitirosilo.  
 59: Éter etílico de nitrohidroxitirosilo

De forma similar al compuesto natural, su análogo nitrocatecol NO<sub>2</sub>HTy y sus derivados lipofílicos, NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E, produjeron un aumento significativo de los niveles extracelulares de DOPAC respecto a los valores basales (Tabla 6.13). Este incremento, aunque en menor medida que para HTy, pone de manifiesto la actividad de estos compuestos y, en particular, la influencia de la estructura *orto*-nitrocatecol en su unión a la enzima (Learmonth y cols., 2004). Aunque esta conformación estructural parece haber centrado todas las miradas en los últimos años aunando intereses hacia la síntesis y evaluación biológica de nuevos nitrocatecoles inhibidores de la COMT (Learmonth y cols., 2004, Learmonth y cols., 2005), nuestros datos no revelan mejores resultados de los compuestos con dicha estructura frente a la estructura catecol. Si atendemos a las variaciones en los niveles de DOPAC, observamos que los derivados NO<sub>2</sub>HTy-A y NO<sub>2</sub>HTy-E no mostraron diferencias significativas en comparación con NO<sub>2</sub>HTy en términos de potencia; sin embargo, sí se observó un aumento significativo de los niveles de DOPAC en un análisis tiempo-respuesta como muestran los resultados (Ver apartado de resultados, objetivo 5). Es decir, los derivados lipofílicos mostraron una acción sobre la enzima ligeramente más prolongada en el tiempo a diferencia de NO<sub>2</sub>HTy, cuya actividad sólo se mantuvo durante el periodo de perfusión.

En base a estos resultados, podríamos afirmar que la cadena lateral hidrocarbonada juega un papel relevante en el anclaje al sitio activo de la enzima permitiendo una unión menos lábil y, por tanto, más estable. En línea con estos resultados, Bonifacio y cols., (2007) han descrito que variaciones en la cadena lateral ejercen una profunda influencia en la modulación de la duración de la actividad de la enzima. Asimismo, nuestros resultados sugieren que, a igualdad de potencia en su actividad sobre la enzima COMT, estos nitroderivados lipofílicos permanecen mayor tiempo en el cerebro, lo que evidencia una capacidad eficiente de penetración incrementando, así, su vida media en el sistema central. De esta forma, podríamos afirmar que la cadena lateral parece cobrar cierta relevancia en nuestro estudio coincidiendo con el interés de algunos autores en diseñar nuevos inhibidores de la COMT con especial afán en incrementar la cadena lateral de estos compuestos (Learmonth y cols., 2002, Bonifacio y cols., 2007).

Por su parte, HTy mostró un tiempo de actuación en el cerebro limitado, similar a NO<sub>2</sub>HTy. Los resultados publicados recientemente por nuestro grupo de investigación han demostrado que HTy presenta una alta capacidad penetrante en el cerebro, pero es rápidamente metabolizado por la enzima COMT a HVAL, lo que podría explicar su corta vida media y, por consiguiente, limitado tiempo de actuación a nivel central sobre la enzima (Gallardo y cols., 2014).

Finalmente, en un análisis del metabolito HVA, se observó una disminución significativa (Tabla 6.14) y sostenida en el tiempo de sus niveles para Ro 41-0960. Por el contrario, el resto de compuestos ensayados tan sólo mostraron una disminución de los niveles de HVA durante el periodo de perfusión de dichos compuestos.

**Tabla 6.14**

Porcentaje de la disminución de los niveles extracelulares de HVA respecto a valores basales (100%) tras los estudios de microdiálisis

	Ro 41-0960	HTy	NO <sub>2</sub> HTy	NO <sub>2</sub> HTy-A	NO <sub>2</sub> HTy-E
<b>% HVA</b>	37,7	83,3	78,8	82,9	75,5

HVA: Ácido homovanílico. Ro 41-0960: Inhibidor comercial. 2: Hidroxitirosol.  
49: Nitrohidroxitirosol. 50: Acetato de nitrohidroxitirosilo.  
59: Éter etílico de nitrohidroxitirosilo

En un análisis global del metabolismo de DA a través de microdialísis, los valores de DOPAC y HVA revelan un efecto de Ro 41-0960 sostenido en el tiempo y que coinciden con estudios encaminados a la obtención de nuevos inhibidores de la COMT con un perfil de larga actuación (Kiss y cols., 2010). Si bien los compuestos fenólicos estudiados, nitrocatecoles y su precursor natural HTy, no presentan dicho perfil de larga actuación, no podemos obviar su actividad a nivel central de la enzima COMT, lo que nos empuja a una propuesta de mejora de estos compuestos con mayor potencia y vida media en el cerebro.

Cabe puntualizar que la medida de los niveles extracelulares de DA por microdialísis ha sido bastante difícil de realizar. Por una parte, debido a los bajos niveles basales que hemos obtenido en los dializados, siendo muy difícil interpretar los resultados que obteníamos. Por otra parte, el hecho de que la DA tiene un tiempo de retención en el cromatograma muy cercano al del HTy, lo que dificultaba la medida de la DA cuando se administraba sistémicamente dicho compuesto. Además, hay que subrayar que también se obtenía un pico de HTy cuando se administraba de forma sistémica  $\text{NO}_2\text{HTy}$ , lo que también dificultaba la medida de DA con este compuesto.

Finalmente, es de destacar que el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) se ha cuantificado para fines comparativos. Este metabolito generado como producto final en la ruta de degradación de la serotonina a través de la MAO y la enzima aldehído deshidrogenasa, es empleado como control interno de nuestro estudio. En el metabolismo de la serotonina no interviene la enzima COMT, lo que explica que los compuestos estudiados (HTy y sus nitroderivados) no tengan ningún efecto sobre los niveles extracelulares de 5-HIAA y sugiere que el efecto que tienen estos compuestos sobre los niveles extracelulares de los metabolitos de DA es, fundamentalmente, a través de la inhibición de la enzima COMT.



## 7. CONCLUSIONES



A continuación se indican las principales conclusiones obtenidas en la presente memoria:

1. Se han puesto a punto los protocolos de síntesis para la obtención de dos series de nitroderivados lipofílicos de hidroxitirosol, con cadenas laterales acílica (ésteres) o alquílica (éteres), ejemplificados en la preparación de un total de 14 compuestos con estructura nitrocatecólica (compuestos **49-62**) a partir de hidroxitirosol.
2. Todas las sustancias preparadas han sido caracterizadas por sus puntos de fusión (sólidos) y sus datos espectroscópicos y sus estructuras han sido determinadas inequívocamente mediante experimentos mono- y bidimensionales de RMN, así como por sus espectros de masas de baja y alta resolución.
3. La evaluación de la capacidad reductora (método FRAP) y de secuestro de radicales libres (métodos ORAC y ABTS) de los nitrocatecoles de ambas series, acílica y alquílica, ha puesto de manifiesto la influencia positiva que ejerce el grupo nitro sobre la actividad antioxidante *in vitro* de estos compuestos en comparación con el hidroxitirosol libre. Además, la longitud de la cadena hidrocarbonada lateral determina la actividad antioxidante, más que el tipo de enlace en sí, mostrando una relación parabólica entre la capacidad antioxidante y la naturaleza lipofílica del compuesto, con un máximo de actividad para una longitud de 2-4 átomos de carbono.
4. Los compuestos nitrohidroxitirosol (**49**), acetato de nitrohidroxitirosilo (**50**) y éter etílico de nitrohidroxitirosilo (**59**) se absorben a través de las células del epitelio intestinal Caco-2, en relación directa a la naturaleza lipofílica del compuesto. Entre un 33-81% de los compuestos absorbidos permanecen sin metabolizar, pudiendo alcanzar el torrente sanguíneo en su estado original.
5. Estos compuestos han demostrado también ser biodisponibles por las células de hepatoma humano, HepG2, y extensivamente

metabolizados, observándose una relación directa con el tiempo de incubación y la naturaleza lipofílica del compuesto.

6. En ambos estudios de biodisponibilidad, intestinal y hepático, el acetato de nitrohidroxitirosilo (**50**) se hidroliza extensivamente generando el compuesto nitrohidroxitirosol (**49**), mientras que el éter etílico de nitrohidroxitirosilo (**59**) no sufre hidrólisis y mantiene su identidad química, dando lugar a metabolitos más lipofílicos. Derivados glucuronidados, metilados y metilglucuronidados son los compuestos identificados del metabolismo de los nitroderivados de hidroxitirosol.
7. Los compuestos nitrohidroxitirosol (**49**), acetato de nitrohidroxitirosilo (**50**) y éter etílico de nitrohidroxitirosilo (**59**), presentan actividad antioxidante en los modelos experimentales de inducción química e hipoxia-reoxigenación empleados como mecanismos de producción de radicales libres en tejido cerebral de rata. Siendo esta actividad menor que la de sus precursores no nitrados.
8. A pesar del efecto antioxidante de los compuestos nitrohidroxitirosol (**49**), acetato de nitrohidroxitirosilo (**50**) y éter etílico de nitrohidroxitirosilo (**59**), no se observa un efecto neuroprotector en el modelo experimental de hipoxia-reoxigenación.
9. Los nitrocatecoles estudiados, nitrohidroxitirosol (**49**), acetato de nitrohidroxitirosilo (**50**) y éter etílico de nitrohidroxitirosilo (**59**), han mostrado una actividad inhibitoria de la actividad COMT significativamente mayor tras el tratamiento crónico en comparación con el agudo. Los nitrocatecoles estudiados modifican el metabolismo de la dopamina, siendo mayor el efecto conseguido con los derivados lipofílicos (**50** y **59**), que el proporcionado por su precursor (**49**). Los compuestos empleados con fines comparativos, hidroxitirosol y el inhibidor comercial (Ro 41-0960), arrojan resultados dispares en función del metabolito estudiado.

10. Los resultados de los estudios *in vivo* concluyen que los nitrocatecoles derivados de HTy también modifican el metabolismo de la dopamina, con una actividad superior para los derivados lipofílicos (**50** y **59**) que ofrecen una acción más prolongada en el tiempo. Los resultados con el Ro 41-0960 han demostrado un perfil de larga actuación sobre la actividad COMT, superior a los compuestos ensayados.



## 8. BIBLIOGRAFÍA



- Ahlmark M, Bäckström R, Luiro A, Pystynen J, Tiainen E. New pharmaceutical compounds. PCT Int. Appl., WO2007/010085 A2. **2007**.
- Alavijeh MS, Palmer AM. Measurement of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of neuroactive compounds. *Neurobiol. Dis.* **2010**; 37:38-47
- Albarracín SL, Stab B, Casas Z, Sutachan JJ, Samudio I, Gonzalez J, Gonzalo L, Capani F, Morales L, Barreto GE. Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. *Nutr. Neurosci.* **2012**; 15:1-9.
- Alcudia F, Cert A, Espartero JL, Mateos R, Trujillo M. Process for the preparation of hydroxytyrosol esters for use as additives in food, cosmetics and pharmaceutical compositions. PCT Int. Appl., 32 pp., WO 2004005237. **2004**.
- Allouche N, Sayadi S. Synthesis of hydroxytyrosol, 2-hydroxyphenylacetic acid, and 3-hydroxyphenylacetic acid by differential conversion of tyrosol isomers using *Serratia marcescens* strain. *J. Agric. Food Chem.* **2005**; 53:6525.
- Alvarez De Manzaneda E, Chahboun R, Haidour B. Method for the preparation of hydroxytyrosol and 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanol from methylenedioxybenzenes. PCT Int. Appl., WO 2009153374. **2009**.
- Amiot MT, Fleuriet A, Macheix JT. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.* **1986**; 34:823-826.
- Anderzhanova E, Wotjak CT. Brain microdialysis and its applications in experimental neurochemistry. *Cell Tissue Res.* **2013**; 354:27-39
- Angerosa F, D'Alessandro N, Corona F, Mellerio G. Characterización of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1996**; 736:195-203.
- Angoa-Pérez M, Rivas-Arancibia S. Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia? *Arch. Neurocién.* **2007**; 12:45-54.
- Ansari MA, Hussain SK, Mudagal MP, Goli D. Neuroprotective effect of allopurinol and nimesulide against cerebral ischemic reperfusion injury in diabetic rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2013**; 17:170-8.
- Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**; 175:880-885.
- Assal F, Spahr L, Hadengue A, Rubbici-Brandt L, Burkhard PR. Tolcapone and Fulminant Hepatitis. *Lancet.* **1998**; 352:958.
- Arvanitoyannis IS, Kassaveti A, Stefanatos S. Olive oil waste treatment: a comparative and critical presentation of methods, advantages & disadvantages. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **2007**; 47:187-229.
- Auñón-Calles D, Canut L, Visioli F. Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol.* **2013**; 55:498-504.
- Axelrod J, Senoh S, Witkop B. O-Methylation of Catechol Amines in vivo. *J. Biol. Chem.* **1958**; 233: 697-701.

## 8. Bibliografía

- Bach-Faig A, Berry EM, Lairon D, Reguant J, Trichopoulou A, Dernini S, Medina FX, Battino M, Belahsen R, Miranda G, Serra-Majem L. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr.* **2011**; 14:2274-2284.
- Bäckström MR, Pystynen J, Lotta T, Ovaska M, Taskinen J. Derivatives of naphthalene with COMT inhibiting activity. *PCT Int. Appl.*, WO2002/22551 A1. **2002**.
- Baldioli M, Servili M, Perretti G, Montedoro GF. Antioxidant activity of tocopherol and phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**; 73:1589-1593.
- Balsano C, Alisi A. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. *Curr. Pharm. Des.* **2009**; 15: 3063-3073.
- Baraldi PG, Simoni D, Manfredini S, Menziani E. Preparation of 3,4-dihydroxybenzeneethanol: A reinvestigation. *Liebigs Ann. Chem.* **1983**; 684-686.
- Barbeau A. L-dopa therapy in Parkinson's disease: A critical review of 9 years of experience. *Can. Med. Assoc. J.* **1969**; 101:791-800.
- Barontini M, Bernini R, Crisante F, Mincione E. Process for preparation of hydroxytyrosol derivatives and hydroxytyrosol by oxidative demethylation. *IT 2007MI1110 A1 20070831.* **2007**.
- Barrington R, Williamson G, Bennett RN, Davis BD, Brodbelt JS, Kroon PA. Absorption, conjugation and efflux of the flavonoids, kaempferol and galangin, using the intestinal Caco-2/TC7 cell model. *J. Funct. Foods.* **2009**; 1:74-87.
- Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, et al. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules.* **2007**; 12:1679-1719.
- Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**; 239:70-76.
- Bernini R, Crisante F, Barontini M, Tofani D, Balducci V, Gambacorta A. Synthesis and structure/antioxidant activity relationship of novel Catecholic antioxidant structural analogues to hydroxytyrosol and its lipophilic esters. *J. Agric. Food Chem.* **2012**; 60:7408-16.
- Berr C, Portet F, Carriere I, Akbaraly TN, Fear C, Gourlet V, Combe N, Barberger-Gateau P, Ritchie K. Olive oil and cognition: results from the Three-City study. *Dementia Geriatr. Cogn. Disord.* **2009**; 28:357-364.
- Bianco A, Passacantili P, Righi G. Acid Rearrangement of Secoiridoids Related to Oleuropein and Secologanin. *Synth. Commun.* **1988**; 18:1765.
- Bianco A, Coccioli F, Guiso M, Marra C. The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans, *Food Chem.* **2001**; 77:405-411.
- Bianco A, Ramunno A. The chemistry of *Olea europea*. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Atta-ur-Rahman (Ed.). The Netherlands, **2006**; 33:859-903.
- Biesalski HK. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **2007**; 10:724-728.
- Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* **1999**; 51:971-974.
- Bonifacio MJ, Palma PN, Almeida L, Soares P. Catechol-O-methyltransferase and its inhibitors in Parkinson diseases, *CNS Drug Rev.* **2007**; 13:352-379.

- Borges N, Vieira-Coelho MA, Parada A, Soares-da-Silva P. Studies on the tight-binding nature of tolcapone inhibition of soluble and membrane-bound rat brain catechol-O-methyltransferase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**; 282:812-817.
- Borgulya J, Brudere H, Bernauer K, Zurher G, Da Prada M. Catechol-O-methyltransferase inhibiting pyrocatechol derivatives: synthesis and structure-activity studies. *Helv. Chim. Acta.* **1989**; 72:952-968.
- Bouallagui Z, Han J, Isoda H, Sayadi S. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **2011**; 49:179-184.
- Bovicelli P, Antonioletti R, Mancini S, Causio S, Borioni G, Ammendola S, Barontini M. Expedient synthesis of hydroxytyrosol and its esters. *Synth. Commun.* **2007**; 37:4245-4252.
- Brenes M, García A, García P, Ríos JJ, Garrido A. Phenolic compounds in Spanish olive oils, *J. Agric. Food Chem.* **1999**; 47:3535-3540.
- Brenes-Balbuena M, de Castro Gómez-Millán A. Production of Antioxidant substances (hydroxytyrosol and elenolic acid glucoside) from process solutions in the manufacture of olives. ES 2, 186, 467, **2003**; SciFinder Scholar. AN 2004:690748.
- Breusing N1, Grune T, Andrisic L, Atalay M, Bartosz G, Biasi F, Borovic S, Bravo L, Casals I, Casillas R, Dinischiotu A, Drzewinska J, Faber H, Fauzi NM, Gajewska A, Gambini J, Gradinaru D, Kokkola T, Lojek A, Luczaj W, Margina D, Mascia C, Mateos R, Meinitzer A, Mitjavila MT, Mrakovcic L, Munteanu MC, Podborska M, Poli G, Sicinska P, Skrzydlewska E, Vina J, Wiswedel I, Zarkovic N, Zelzer S, Spickett CM. An inter-laboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples. *Free Radic. Res.* **2010**; 4:1203-1215.
- Briante R, Patumi M, Febbraio F, Nucci R. Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase. *J. Biotech.* **2004**; 111:67-77.
- Bulotta S, Corradino R, Celano M, D'Agostino M, Maiuolo J, Oliverio M, Procopio A, Iannoneb M, Rotirotia D, Russo D. Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. *Food Chem.* **2011**; 127:1609-1614.
- Burattini S, Salucci S, Baldassarri V, Accorsi A, Piatti E, Madrona A, Espartero JL, Candiracci M, Zappia G, Falcieri E. Anti-apoptotic activity of hydroxytyrosol and hydroxytyrosyl laurate, *Food Chem. Toxicol.* **2013**; 55:248-256.
- Cabrerizo S, De La Cruz JP, López-Villodres JA, Muñoz-Marín J, Guerrero A, Reyes JJ, Labajos MT, González-Correa JA. Role of the inhibition of oxidative stress and inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *J. Nutr. Biochem.* **2013**; 24:2152-7.
- Calderon-Montañó JM, Madrona A, Burgos-Moron E, Orta ML, Mateos S, Espartero JL, Lopez-Lazaro M. Selective Cytotoxic Activity of New Lipophilic Hydroxytyrosol Alkyl Ether Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **2013**; 61:5046-5053.
- Cantarelli C. Polyphenols in the fruit and in olive oil. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* **1961**; 38:69-72.
- Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad. Biol. Med.* **1997**; 22:749-760.
- Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, Carluccio M, Scoditti E, Distanti A, Storelli C, De Caterina R. Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF- $\kappa$ B and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**; 293:2344-2354.

## 8. Bibliografía

- Carrera-Gonzalez MP, Ramirez-Exposito MJ, Mayas MD, Martinez-Martos JM. Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**; 31:92-99.
- Caruso D, Visioli F, Patelli R, Galli C, Galli G. Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans. *Metabolism.* **2001**; 50:1426-1428.
- Casas R, Sacanella E, Urpí-Sardà M, Chiva-Blanch G, Ros E, Martínez-González MA, Covas MI; Rosa Ma Lamuela-Raventos, Salas-Salvadó J, Fiol M, Arós F, Estruch R. The effects of the mediterranean diet on biomarkers of vascular wall inflammation and plaque vulnerability in subjects with high risk for cardiovascular disease. A randomized trial. *PLoS One.* **2014**; 9:e100084.
- Cert A, Alba J, León-Camacho M, Moreda W, Pérez-Camino MC. Effects of talc addition and operating mode on the quality and oxidative stability of virgin olive oils obtained by centrifugation, *J. Agric. Food Chem.* **1996**; 44:3930-3934.
- Cert A. y cols. Preparación y estudio de las propiedades funcionales del hidroxitirosol, 3',4'-dihidroxifenilglicol y ésteres de hidroxitirosilo como ingredientes de los alimentos. **2004**, Proyecto CICYT: AGL2004-07935-C03.
- Cert A. y cols. Preparación y evaluación de éteres de hidroxitirosilo como componentes funcionales de alimentos. **2007**, Proyecto CICYT: AGL2007-66373-C04.
- Cert A, Romero A, Mateos R, Alcudia F, Espartero JL, Trujillo M. Lipase catalyzed transesterification of oils and fats with hydroxytyrosol increase antioxidant content, *PCT Int. Appl. WO 2012042080 A1 20120405.* **2012**.
- Chen Y, Huang C, Zhou T, Chen G. Genistein induction of human sulfotransferases in HepG2 and Caco-2 cells. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2008**; 103:553-559.
- Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, Maier CM, Narasimhan P, Goeders CE, Chan PH. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**; 14:1505-17.
- Chimi H, Cillard J, Cillard P, Rahmani M. Peroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**; 68:307-312.
- Chimi H, Sadik A, Le Tutour B, Rahmani M. Contribution a l'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol, de l'hydroxytyrosol, de l'acide caféique, de l'oleuropéine et du BHT, *Rev. Franc. Corps Gras.* **1998**; 35:339-344.
- Chiva-Blanch G, Badimon L, Estruch R. Latest evidence of the effects of the mediterranean diet in prevention of cardiovascular disease. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2014**; 16(446):1-7.
- Cofrades S, Salcedo Sandoval L, Delgado-Pando G, López-López I, Ruiz-Capillas C, Jiménez-Colmenero F. Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chem.* **2011**; 129:429-436.
- Colissimo, C. The Rise and Fall of Tolcapone. *J. Neurol.* **1999**; 246:880-2.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* **2003**; 17:1195-1214.
- Copeland RA. Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis. Wiley, New York. **2000**; 2nd Ed, pp 305-317.
- Cornwell DG, Ma JY. Nutritional benefit of olive oil: the biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *J. Agric. Food Chem.* **2008**; 56:8774-8786.

- Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N. Engl. J. Med.* **1967**; 267:374-379.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R. Modification of Parkinsonism-Chronic treatment with L-dopa. *N. Engl. J. Med.* **1969**; 280:337-345.
- Couto E, Sandin S, Löf M, Ursin G, Adami HO, Weiderpass E. Mediterranean dietary pattern and risk of breast cancer. *PLoS One.* **2013**; 8:e55374.
- Covas MI, De la Torre K, Farré-Albaladejo M, Kaikkonen J, Fitó M, López-Sabater C, Pujadas-Bastardes MA, Joglar J, Weinbrenner T, Lamuela-Raventos RM, De La Torre R. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radic. Biol. Med.* **2006a**; 40:608-616.
- Covas MI, Nyyssonen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, Gaddi A, de la Torre R, Mursu J, Baumler H, Nascetti S, Salonen JT, Fito M, Virtanen J, Marrugat J. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann. Inter. Med.* **2006b**; 145:333-341.
- Curtis PJ, Sampson M, Potter J, Dhatariya K, Kroon PA, Cassidy A. Chronic ingestion of flavan-3-ols and isoflavones improves insulin sensitivity and lipoprotein status and attenuates estimated 10-year CVD risk in medicated postmenopausal women with type 2 diabetes: a 1-year, double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Care.* **2012**; 35:226-322012.
- D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, Pontoni G, Galleti P, Zappia V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metab. Disp.* **2001**; 29:1492-1498.
- D'Angelo S, Ingrosso D, Migliardi V, Sorrentino A, Donnarumma G, Baronj A, Masella L, Tufano MA, Zappia M, Galleti P. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**; 38:908-919.
- D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scaccocchio B, Masella R. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**; 11:1321-1342.
- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* **2003**; 39:889-909.
- Day AJ, Bao Y, Morgan MR, Williamson G. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**; 29:1234-1243.
- De Bock M, Thorstensen EB, Derraik JG, Henderson HV, Hofman PL, Cutfield WS. Human absorption and metabolism of oleuropein and hydroxytyrosol ingested as olive (*Olea europaea* L.) leaf extract. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**; 57:2079-85.
- De La Cruz JP, Villalobos MA, Cuerda MA, Guerrero A, González-Correa JA, Sánchez De La Cuesta F. Effects of S-adenosyl-L-methionine on lipid peroxidation and glutathione levels in rat brain slices exposed to reoxygenation after oxygen-glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* **2002**; 318:103-7.
- De La Cruz JP, Del Río S, López-Villodres JA, Villalobos MA, Jebrouni N, González-Correa JA. Virgin olive oil administration improves the effect of aspirin on retinal vascular pattern in experimental diabetes mellitus. *Br. J. Nutr.* **2010**; 104:560-565.
- De la Torre R. Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans. *Inflammopharmacol.* **2008**; 16:245-247.
- De la Torre-Carbot K, Chávez-Servin JL, Jáuregui O, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, Nurmi T, Poulsen HE, Gaddi AV, Kaikkonen J, Zunft HF, Kiesewetter H, Fitó M, Covas MI, López-Sabater

## 8. Bibliografía

- MC. Elevated circulating LDL phenol levels in men who consumed virgin olive rather than refined olive oil are associated with less oxidation of plasma LDL. *J. Nutr.* **2010**; 140:501-508.
- De Lange EC, Ravenstijn PG, Groenendaal D, Van Steeg TJ. Toward the prediction of CNS drug-effect profiles in physiological and pathological conditions using microdialysis and mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling. *AAPS J.* **2005**; 7:E532-E543.
- Deiana M, Corona G, Incani A, Loru D, Rosa A, Atzeri A, Paola-Melis M, Dessi M.A. Protective effect of simple phenols from extra virgin olive oil against lipid peroxidation in intestinal Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.* **2010**; 48:3008-3016.
- Deiana M, Incani A, Rosa A, Corona G, Atzeri A, Loru D, Melis MP, Dessi MA. Protective effect of hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced lipid peroxidation in renal tubular epithelial cells. *Food Chem. Toxicol.* **2008**; 46:2984-2990.
- Deseano-Estudillo JL, Castañón-González JA, Carbajal-Ramírez A, Castrejón-Román H, León-Gutiérrez MA. Cerebral Blood flow velocity spectrum by transcranial doppler ultrasound in patients with brain death clinical criteria. *Gac. Med. Mex.* **2003**; 139:535-8.
- Di Giovacchino L, Solinas M, Miccoli M. Effect of extraction systems on the quality of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1994**; 71:1189-1194.
- Di Meo F, Lemaur V, Cornil J, Lazzaroni R, Duroux JL, Olivier Y, Trouillas P. Free radical scavenging by natural polyphenols: atom versus electron transfer. *J. Phys. Chem.* **2013**; 117: 2082-2092.
- Dingemans J, Jorga K, Schmitt M, Gieschke R, Fotteler B, Zurcher G, Da Prada M, van Brummelen P. Integrated pharmacokinetics and pharmacodynamics of the novel catechol-O-methyltransferase inhibitor tolcapone during first administration to humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1995**; 57:508-517.
- Djuric Z. The Mediterranean diet: effects on proteins that mediate fatty acid metabolism in the colon. *Nutr Rev.* **2011**; 69:730-44.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); "Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage ...". *EFSA J.* **2011**; 9:2033 (25 p).
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); "Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to polyphenols in olive and maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations...". *EFSA J.* **2012**, 10:2848 (14 p).
- Espartero JL, Mateos R, Trujillo M, Cert A, Alcludia F. Caracterización estructural de nuevos polifenoles presentes en el aceite de oliva, en Libro de Resúmenes del XXVII Congreso Bienal de la Real Sociedad Española de Química (RSQC). La Laguna. **1999**; 165.
- Espartero JL, y col. Aprovechamiento de subproductos de la industria olivarera. Síntesis y evaluación de nuevos antioxidantes con potencial aplicación en el tratamiento del Parkinson. **2009**. Proyecto de Excelencia Junta de Andalucía: P09-AGR-5098.
- Espín JC, Soler-Rivas C, Cantos E, Tomás-Barbarán FA, Wichers HJ. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *J. Agric. Food Chem.* **2001**; 49:1187-1193.
- Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA. PREDIMED Study Investigators. Primary prevention of Cardiovascular disease with Mediterranean Diet. *N. Engl. J. Med.* **2013**; 368:1279-90.

- Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Selvaggini R, Montedoro GF, Di Saverio C, Morozzi G. Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *J. Nutr.* **2006**; 136:614-619.
- Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J. Nutr.* **2008**; 138:1411-1416.
- Fabiani R, Fuccelli R, Pieravanti F, De Bartolomeo A, Morozzi G. Production of hydrogen peroxide is responsible for the induction of apoptosis by hydroxytyrosol on HL60 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**; 53:887-896.
- Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Morozzi G. The production of hydrogen peroxide is not a common mechanism by which olive oil phenol compounds induce apoptosis on HL60 cells. *Food Chem.* **2011**; 125:1249-1255.
- Farràs M, Valls RM, Fernández-Castillejo S, Giralt M, Solà R, Subirana I, Motilva MJ, Konstantinidou V, Covas MI, Fitó M. Olive oil polyphenols enhance the expression of cholesterol efflux related genes in vivo in humans. A randomized controlled trial. *J. Nutr. Biochem.* **2013**; 24:1334-9.
- FDA. Guidance for industry: Walver of in vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosages Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, USA, **2000**.
- Fernández-Bolaños J, Heredia A, Rodríguez G, Rodríguez R, Jiménez A, Guillén R. Methods for obtaining purified hydroxitirosol from products and by-products derived from the olive tree. US 6,849,770 B2. **2005**.
- Fernández-Bolaños J, López O, López-García MA, Maset A. Biological Properties of Hydroxytyrosol and Its Derivatives, en Boskou D. (Ed.). Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions, InTech, **2012**, 375-396, ISBN: 978-953-307-921-9.
- Ferrís-Tortajada J, Berbel-Tornero O, García-Castell J, Ortega-García JA, López-Andreu JA. Dietetic factors associated with prostate cancer: protective effects of Mediterranean diet. *Actas Urol. Esp.* **2012**; 36:239-245.
- Finley JW, Kong AN, Hintze KJ, Jeffery EH, Ji LL, Lei XG. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *J. Agric. Food Chem.* **2011**; 59:6837-46.
- Fitó M, Cladellasc M, de la Torre R, Martí J, Alcantara M, Pujadas-Bastardes M, Marrugat J, Bruquera J, López-Sabater MC, Vila J, Covas MI. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis.* **2005**; 181:149-158.
- Forsberg M.M, Huotari M, Savolainen J, Mannisto P.T. The Role of Physicochemical Properties of Entacapone and Tolcapone on Their Efficacy During Local Intrastratial Administration. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**; 24:503-511.
- Friedman A, Galazka-Friedman J. The history of the research of iron in parkinsonian substantia nigra. *J. Neural. Transm.* **2012**; 119:1507-1510.
- Furneri PM, Piperno A, Sajia A, Bisignano G. Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**; 48:4892-4894.
- Gainetdinov RR, Fumagalli F, Jones SR, Caron MG. Dopamine transporter is required for in vivo MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *J. Neurochem.* **1997**; 69:1322-5.

## 8. Bibliografía

- Gal S, Fridkin M, Amit T, Zheng H, Youdim MB. M30, a novel multifunctional protective drug with potent iron chelating and brain selective monoamine oxidase-ab inhibitory activity for Parkinson's disease. *J. Neural. Trnsm. Suppl.* **2006**; 70:447-456.
- Gallardo E, Palma-Valdés R, Espartero JL, Santiago M. In vivo striatal measurement of hydroxytyrosol, and its metabolite (homovanillic alcohol), compared with its derivative nitrohydroxytyrosol. *Neurosci. Lett.* **2014**; 579:173-176
- García-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Nevedomskaya E, Mayboroda OA, Deelder AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Exploratory analysis of human urine LC-ESI-TOF MS after high intake of olive oil: understanding the metabolism of polyphenols. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**; 398:463-475.
- García-Villalba R, Larrosa M, Possemiers S, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Bioavailability of phenolics from an oleuropein-rich olive (*Olea europaea*) leaf extract and its acute effect on plasma antioxidant status: comparison between pre- and postmenopausal women. *Eur. J. Nutr.* **2014**; 53:1015-27.
- Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Gatenby P, Gerbi V, Janssens J, Johnston B, Kas K, La Vecchia C, Mainguet P, Morazzoni P, Negri E, Pelucchi C, Pezzotti M, Rondanelli M. Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *Eur. J. Cancer Prev.* **2013**; 22:90-5.
- Gimeno E, De la Torre-Carbot K, Lamuela-Raventós RM, Castellote AL, Fitó M, De la Torre R, Covas MI, López-Sabater MC. Changes in the phenolic content of low density lipoprotein after olive oil consumption in men. A randomized crossover controlled trial. *Br. J. Nutr.* **2007**; 98:1243-1250.
- Giovannini C, Straface E, Modesti D, Coni E, Cantafora A, De Vincenzi M. Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized LDL-induced injury in Caco2 cells. *J. Nutr.* **1999**; 129:1269-1277.
- Gomes P, Soares P. Interaction between L-DOPA and 3-O-methyl-L-DOPA for transport in immortalised rat capillary cerebral endothelial cells, *Neuropharmacol.* **1999**; 38:1371-1380.
- Gómez-Acebo E, Alcami Pertejo J, Aunon Calles D. Topical use of hydroxytyrosol and derivatives for the prevention of HIV infection. *Pat. Appl. Publ. WO 2011067302 A1.* **2011**.
- Gong D, Geng C, Jiang L, Cao J, Yoshimura H, Zhong, L. Effects of hydroxytyrosol-20 on carrageenan-induced acute inflammation and hyperalgesia in rats. *Phytother. Res.* **2009**; 23:646-650.
- González-Correa JA, Arrebola MM, Guerrero A, Cañada MJ, Muñoz Marín J, Sánchez De la Cuesta F, De la Cruz JP. Antioxidant and antiplatelet effects of the alpha-tocopherol-aspirin combination in type 1-like diabetic rats. *Life Sci.* **2006**; 79:1405-1412.
- González-Correa JA, Muñoz-Marín J, Arrebola MM, Guerrero A, Narbona F, López-Villodres JA, De La Cruz JP. Dietary virgin olive oil reduces oxidative stress and cellular damage in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lipids.* **2007**; 42:921-929.
- González-Correa JA, Navas MD, Lopez-Villodres JA, Trujillo M, Espartero JL, de la Cruz, JP. Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Neurosci. Lett.* **2008a**; 446:143-146.
- González-Correa JA, Navas MD, Muñoz-Marín J, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, De La Cruz JP. Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *J. Agric. Food Chem.* **2008b**; 56:7872-7876.
- González-Correa JA, López-Villodres JA, Asensi R, Espartero JL, Rodríguez-Gutiérrez G, De La Cruz JP. Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in

- human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid. *Brit. J. Nutr.* **2009**; 101:1157-1164.
- Gordin A, Kaakkola S, Teravainen H. Clinical advantages of COMT inhibition with Entacapone. A review. *J. Neural Transm.* **2004**; 111:1343-1363.
- Gordon MH, Paiva-Martins F, Almeida M. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2001**; 49:2480-2485.
- Goya L, Mateos R, Bravo L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Eur. J. Nutr.* **2007**; 46:70-78.
- Graham JM, Rickwood, D. Eds. *Subcellular Fractionation-A Practical Approach*; Oxford University Press; Oxford, U.K., pp 205-242, **1997**.
- Grasso S, Siracusa L, Spataforma C, Renis M, Tringali C. Hydroxytyrosol lipophilic analogues: Enzymatic synthesis, radical scavenging activity and DNA oxidative damage protection. *Bioorg. Chem.* **2007**; 35:137-152.
- Grosso G, Buscemi S, Galvano F, Mistretta A, Marventano S, La Vela V, Drago F, Gangi S, Basile F, Biondi A. Mediterranean diet and cancer: epidemiological evidence and mechanism of selected aspects. *BMC Surg.* **2013**; 13 Suppl 2:S14.
- Guasch-Ferré M, Hu FB, Martínez-González MA, Fitó M, Bulló M, Estruch R, Ros E, Corella D, Recondo J, Gómez-Gracia E, Fiol M, Lapetra J, Serra-Majem L, Muñoz MA, Pintó X, Lamuela-Raventós RM, Basora J, Buil-Cosiales P, Sorlí JV, Ruiz-Gutiérrez V, Martínez JA, Salas-Salvadó J. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Med.* **2014**; 12(78):1-11.
- Guerrero A, De La Cruz JP, Muñoz-Marin J, Lopez-Villodres JA, Madrona A, Espartero JL, González-Correa JA. Neuroprotective effect of alkyl hydroxytyrosyl ethers in rat brain slices subjected to a hypoxia-reoxygenation model. *Food Chem.* **2012**; 134:2176-2183.
- Guichard C, Pedrucci E, Fay M, Marie JC, Braut-Boucher F, Daniel F, Grodet A, Gougerot-Pocidalo MA, Chastre E, Kotelevets L, Lizard G, Vandewalle A, Driss F, Ogier-Denis E. Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis.* **2006**; 27:1812-1827.
- Guiso M, Marra C, Cavarischia C. Isochromans from 2-(3',4'-dihydroxy)phenylethanol. *Tetrahedron Lett.* **2001**; 42:6531-6534.
- Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**; 58:966-968.
- Gutiérrez R, Janer C, Janer ML, Gutiérrez F. Relación entre los polifenoles y la calidad y estabilidad del aceite de oliva virgen. *Grasas y Aceites.* **1977**; 28:101-106.
- Haddad JJ. Science review: redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for hypoxia-inducible factor-1alpha. *Crit. Care.* **2003**; 7:47-54.
- Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**; 662:78-84.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in biology and medicine*. 4th Edition. Oxford University Press. **2007**.
- Hamada A, Yaden EL, Horng JS, Ruffolo RR, Patil PN, Miller DD. N-substituted imidazolines and ethylenediamines and their action on alpha- and beta-adrenergic receptors. *J. Med. Chem.* **1985**; 28:1269-73.

## 8. Bibliografía

- Hamden K, Allouche N, Jouadi B, El-Fazaa S, Gharbi N, Carreau S, Damak M, Elfeki A. Inhibitory action of purified hydroxytyrosol from stored olive mill waste on intestinal disaccharidases and lipase activities and pancreatic toxicity in diabetic rats. *Food Sci. Biotech.* **2010**; 19:439-447.
- Haramaki N, Stewart DB, Aggarwal S, Kawabata T, Packer L. Role of ascorbate in protection by nitecapone against cardiac ischemia-reperfusion injury. *Biochemical Pharmacology.* **1995**; 50:839-843.
- Harborne JB. General procedures and measurements of total phenolics in "plant phenolics", from "Methods in plant biochemistry series"; Dey PM. & Harborne JB. (Eds.), Vol. 1, Academic Press, Londres, **1989**.
- Hayashi M. Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology.* **2009**; 29:1-8.
- Hillestrom PR, Covas MI, Poulsen HE. Effect of dietary virgin olive oil on urinary excretion of etheno-DNA adducts. *Free Radic Biol Med.* **2006**; 41:1133-1138.
- Hollman PC, Cassidy A, Comte B, Heinonen M, Richelle M, Richling E, Serafini M, Scalbert, Sies H, Vidry S. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J. Nutr.* **2011**; 141:989S-1009S.
- Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, Rimm EB, Cassidy A. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**; 95:740-751.
- Hrenn A, Steinbrecher T, Labahn A, Schwager J, Schemp CM, Merfort I. Plant phenolics inhibit neutrophil elastase. *Planta Med.* **2006**; 72:1127-1131.
- Hu FB. Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Curr. Opin. Lipidol.* **2002**; 13:3-9.
- Hu T, He XW, Jiang JG, Xu XL. Hydroxytyrosol and Its Potential Therapeutic Effects. *J. Agric. Food Chem.* **2014**; 62:1449-1455.
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanang JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* **2002**; 50:1815-1821.
- Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays, **2005**; *J. Agric. Food Chem.* **2005**; 53:1841-1856.
- Hubatsch I, Ragnarsson EG, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat. Protoc.* **2007**; 2:2111-2119.
- Incani A, Deiana M, Conona D, Vafiadou K, Vauzour D, Dessi MA, Spencer JPE. Involvement of ERK, Akt and JNK signaling in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell injury and protection by hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**; 54:788-796.
- Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J. Agric. Food Chem.* **2009**; 57:8798-8804.
- Kaakkola S, Wurtman RJ. Effects of COMT inhibitors on striatal dopamine metabolism: A microdialysis study. *Brain Res.* **1992**; 587:241-249.
- Kaddoumi A, Nakashima MN, Maki T, Matsumura Y, Nakamura J, Nakashima K. Liquid chromatography studies on the pharmacokinetics of phentermine and fenfluramine in brain and blood microdialysates after intraperitoneal administration to rats. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**; 791:291-303.

- Kaldas MI, Walle K, Walle T. Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **2003**; 55:307-312.
- Kamat CD, Gadgil S, Mhatre M, Williamson KS, Pye QN, Hensley K. Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *J. Alzheimers Dis.* **2008**; 15:473-493.
- Kawabata T, Schepkin V, Haramaki N, Phadke RS, Packer L. Iron coordination by catechol derivative antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* **1996**; 51:1569-1577.
- Keranen T, Gordin A, Harjola VP, Karlsson M, Korpela K, Pentikainen PJ, Rita H, Seppala L, Wikberg T. Inhibition of Soluble Catechol-O-methyltransferase and Single-Dose Pharmacokinetics after Oral and Intravenous Administration of Entacapone. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1994**; 46:151-157.
- Khymenets O, Fitó M, Touriño S, Muñoz-Aguayo D, Pujadas M, Torres JL, Joglar J, Farré M, Covas MI, De la Torre R. Antioxidant activities of hydroxytyrosol main metabolites do not contribute to beneficial health effects after olive oil ingestion. *Drug Metab. Dispos.* **2010**, 38:1417-1421.
- Gavazov KB. Nitroderivatives of Catechol: from Synthesis to Application. *Acta Chim. Slov.* **2012**, 59:1-17
- Kiss LE, Ferreira HS, Torrão L, Bonifácio MJ, Palma PN, Soares-da-Silva P, Learmonth DA. Discovery of a long-acting, peripherally selective inhibitor of catechol-O-methyltransferase. *J. Med. Chem.* **2010**; 53:3396-3411.
- Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**; 80:15-21.
- Laguerre M, Giraldo LJ, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Barea B, Weiss J. Chain length affects antioxidant properties of chlorogenate esters in emulsion: The cutoff theory behind the polar paradox. *J. Agric. Food Chem.* **2009**; 57:11335-11342.
- Laguerre M, Lopez-Giraldo LJ, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Barea B, Weiss J, Decker EA, Villeneuve P. Relationship between hydrophobicity and antioxidant ability of "phenolipids" in emulsion: A parabolic effect of the chain length of rosmarinic esters. *J. Agric. Food Chem.* **2010**; 58:2869-2876.
- Laguerre M, Bayrasy C, Lecomte J, Chabi B, Decker EA, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Villeneuve P. How to boost antioxidants by lipophilization? *Biochimie.* **2013**; 95:20-6.
- Laguerre M, Bayrasy C, Panya A, Weiss J, McClements DJ, Lecomte J, Decker EA, Villeneuve P. What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2014**; 55:183-201.
- Larrosa M, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Antioxidant capacity of tomato juice functionalised with enzymatically synthesised hydroxytyrosol. *J. Sci. Food Agric.* **2003**; 83:658-666.
- Learmonth DA, Vieira-Coelho MA, Benes J, Alves PC, Borges N, Freitas AP, Soares-da-Silva P. Synthesis of 1-(3,4-Dihydroxy-5-nitrophenyl)-2-phenyl-ethanone and Derivatives as Potent and Long-Acting Peripheral Inhibitors of Catechol-O-methyltransferase. *J. Med. Chem.* **2002**; 45:685-695.
- Learmonth D A, Palma PN, Vieira-Coelho MA, Soares da-Silva, P. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies of a Novel, Peripherally Selective Inhibitor of Catechol-O-Methyltransferase. *J. Med. Chem.* **2004**; 47:6207-6217.
- Learmonth DA, Bonifacio MJ, Soares-da-Silva P. Synthesis and biological evaluation of a novel series of "ortho-nitrated" inhibitors of catechol-O-methyltransferase. *J. Med. Chem.* **2005**; 48:8070-8078.

## 8. Bibliografía

- Learmonth DA, Kiss LE, Palma PN, Ferreira H, Soares-da-Silva P. Nitrocatechol derivatives as COMT inhibitors. *WO2007/013830 A1*. **2007**.
- Lee-Huang S, Lin Huang P, Zhang D, Wook Lee J, Bao J, Sun Y, Chang YT, Zhang J, Huang PL. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. Integrase inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007a**; 354: 872-878.
- Lee-Huang S, Lin Huang P, Zhang D, Wook Lee J, Bao J, Sun Y, Chang YT, Zhang J, Huang PL. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part II. Integrase inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007b**; 354: 879-884.
- Lee-Huang S, Huang PL, Huang PL, Zhang D, Zhang JZH, Chang YT. Compositions and methods for treating obesity, obesity related disorders and for inhibiting the infectivity of human immunodeficiency virus. **2009**; US Pat Appl Publ US 20090061031 A1 20090305.
- Locatelli C, Rosso R, Santos-Silva MC, De Souza CA, Licinio MA, Leal P, Bazzo ML, Yunes RA, Creczynski-Pasa TB. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**; 16:3791-3799.
- Lopez-Garcia E, Rodriguez-Artalejo F, Li TY, Fung TT, Li S, Willett WC, Rimm EB, Hu FB. The Mediterranean-style dietary pattern and mortality among men and women with cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**; 99:172-180.
- López-Villodres JA, De La Cruz JP, Muñoz-Marín J, Guerrero A, Reyes JJ, González-Correa JA. Cytoprotective effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs in rat brain slices subjected to reoxygenation after oxygen-glucose deprivation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**; 45:624-631.
- Lorenz P. Use of 1-arylisochroman derivatives as cell proliferation inhibitors for the treatment of cancer. *Ger.* **2006**, 17 pp., DE 102006005221.
- Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K, Julkunen I, Taskinen J. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferase: A revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochem.* **1995**; 34:4202-4210.
- Lucas L, Russell A, Keast R. Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Curr. Pharm. Des.* **2011**; 17:754-768.
- Machowetz A, Poulsen HE, Gruendel S, Weimann A, Fito M, Marrugat J, De la Torre R, Salonen JT, Nyyssonen K, Mursu J, Nascetti S, Gaddi A, Kiesewetter H, Baumler H, Selmi H, Kaikkonen J, Zunft HJ, Covas MI, Koebnick C. Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. *FASEB J.* **2007**; 21:45-51.
- Madrona A, Pereira-Caro G, Mateos R, Rodríguez G, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, et al. Synthesis of hydroxytyrosyl alkyl ethers from olive oil waste waters. *Molecules.* **2009**; 14: 1762-1772.
- Madrona A, Pereira-Caro G, Bravo L, Mateos R, Espartero JL. Preparation and antioxidant activity of tyrosyl and homovanillyl ethers. *Food Chem.* **2011**; 129: 1169-1178.
- Manach C, Morand C, Demigné C, Texier O, Régéat F, Rémésy C. Bioavailability of quercetin and rutin in rats. *FEBS Lett.* **1997**; 409:12-16.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**; 79:727-47.
- Manna C, Migliardi V, Sannino F, De Artino A, Capasso R. Protective effects of synthetic hydroxytyrosol acetyl derivatives against oxidative stress in human cells. *J. Agric. Food Chem.* **2005**; 53:9602-9607.

- Mannisto PT, Kaakkola S, Nissinen E, Linden I, Pohto P. Properties of novel effective and highly selective inhibitors of catechol-O-methyltransferase. *Life Sci.* **1988**; 43:1465-1471.
- Mannisto P, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): Biochemistry, Molecular Biology, Pharmacology, and Clinical Efficacy of the New Selective COMT Inhibitors. *Pharm. Rev.* **1999**; 51:593-628.
- Marcocci L, Maguire JJ, Packer L. Nitrocapone: A nitric oxide radical scavenger. *Biochem Mol Biol.* **1994**; 34:531-541.
- Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *J. Chromatog. B.* **2005**; 827:65-75.
- Marrugat J, Covas MI, Fitó M, Schröder H, Miró-Casas E, Gimeno E, López-Sabater M, De la Torre R, Magí F. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation. A randomized controlled trial. *Eur. J. Nutr.* **2004**; 43:140-147.
- Martín MA, Ramos S, Granado-Serrano AB, Rodríguez-Ramiro I, Trujillo M, Bravo L, Goya L. Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxificant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**; 54:956-966.
- Martínez-Lapiscina EH, Clavero P, Toledo E, Estruch R, Salas-Salvador J, San Julián B, Sanchez-Tainta A, Ros E, Valls-Pedret C, Martínez-González MÁ. Mediterranean diet improves cognition: the PREDIMED-NAVARRA randomised trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **2013**; 84:1318-1325.
- Masella R, Vari R, D'Archivio M, Di Benedetto R, Matarrese P, Malorni W, Scazzocchio B, Giovannini C. Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J. Nutr.* **2004**; 134:785-791.
- Mateos R, Espartero JL, Trujillo M, Ríos JJ, Leon M, Alcuía F et al. Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.* **2001**; 49: 2185-2192.
- Mateos R. Caracterización de componentes fenólicos del aceite de oliva y su relación con la estabilidad oxidativa y el amargor. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla; **2002**.
- Mateos R, Domínguez MM, Espartero JL, Cert A. Antioxidant effect of phenolic compounds,  $\alpha$ -tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2003**; 51: 7170-7175.
- Mateos R, Trujillo M, Pérez-Camino MC, Moreda W, Cert A. Relationships between oxidative stability, triacylglycerol composition, and antioxidant content in olive oil matrices. *J. Agric. Food Chem.* **2005a**; 53:5766-5771.
- Mateos R, Goya L, Bravo L. Metabolism of the olive oil phenols hydroxytyrosol, tyrosol and hydroxytyrosyl acetate by human hepatoma HepG2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2005b**; 53:9897-9905.
- Mateos R, Bravo L. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids and proteins). *J. Sep. Sci.* **2007**; 30:175-191.
- Mateos R, Trujillo M, Pereira-Caro G, Madrona A, Cert A, Espartero JL. New lipophilic tyrosyl esters. Comparative antioxidant evaluation with hydroxytyrosyl esters. *J. Agric. Food Chem.* **2008**; 56: 10960-10966.

## 8. Bibliografía

- Mateos R, Pereira-Caro G, Saha S, Cert M, Redondo-Horcajo M, Bravo L, Kroon PA. Acetylation of hydroxytyrosol enhances its transport across differentiated Caco-2 cell monolayer. *Food Chem.* **2011**; 125:865-872.
- McCord JM. Evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* **2000**; 108:652-659.
- Meinl W, Ebert B, Glatt H, Lampen A. Sulfotransferase forms expressed in human intestinal Caco-2 and TC7 cells at varying stages of differentiation and role in benzo [a] pyrene metabolism. *Drug Metab. Dispos.* **2008**; 36:276-283.
- Menéndez C; Duenas M; Galindo P; Gonzalez-Manzano S; Jimenes R; Moreno L; Zarzuelo MJ; Rodriguez-Gomez I; Duarte J; Santos-Buelga C; Perez-Vizcaino F. Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed?. *Mol Nutr Food Res.* **2011**; 55:1780-90.
- Miró-Casas E, Covas MI, Farré M, Fitó M, Ortuño J, Weinbrenner T, Roset P, De la Torre R. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin. Chem.* **2003**; 49:945-952.
- Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulia B, Zeinanloo AA, Khoshbaten A. Dietary virgin olive oil reduces blood brain barrier permeability, brain edema, and brain injury in rats subjected to ischemia-reperfusion. *Sci. World J.* **2010**; 10:1180-9.
- Montaner J. Latest advances and research in stroke treatment 2007. *Drug News Perspect.* **2007**; 20:197-208.
- Montedoro G, Cantarelli C. Investigations on the phenolic substances present in olive oils. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* **1969**; 46:115-124.
- Montedoro GF, Garofolo L. The qualitative characteristics of virgin olive oils. The influence of variables such as variety, environment, preservation, extraction, conditioning of the finished product. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* **1984**; 61:157-168.
- Montedoro G, Serivili M, Baldioli M, Miniati E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **1992**; 40: 1571-1576.
- Muñoz-Marín J, De La Cruz JP, Guerrero A, Lopez-Leiva I, Lopez-Villodres JA, Reyes JJ, Gonzalez-Correa JA. Cytoprotective Effect of Hydroxytyrosyl Alkyl Ether Derivatives after Oral Administration to Rats in a Model of Glucose- Oxygen Deprivation in Brain Slices. *J. Agric. Food Chem.* **2012**; 60: 7659-7664.
- Muñoz-Marín J, De La Cruz JP, Reyes JJ, Lopez-Villodres JA, Guerrero A, Lopez-Leiva I, Espartero JL, Labajos MT, Gonzalez-Correa JA. Hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives inhibit platelet activation after oral administration to rats. *Food Chem. Toxicol.* **2013**; 58:295-300.
- Napolitano A, Panzella L, Savarese M, Sacchi R, Giudicianni I, Paolillo L, d'Ischia M. Acid-induced structural modifications of unsaturated fatty acids and phenolic olive oil constituents by nitrite ions: a chemical assessment. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**; 17:1329-1337.
- Nicolaiew N, Lemort N, Adorni L, Berra B, Montorfano G, Rapelli S, Cortesi N, Jacotot B. Comparison between extra virgin olive oil and oleic acid rich sunflower oil: effects on postprandial lipemia and LDL susceptibility to oxidation. *Ann. Nutr. Metab.* **1998**; 42:251-260
- Nissinen E. Basic aspects of Catechol-O-methyltransferase and the clinical applications of its inhibitors. 1ª Ed., **2010**, Academic Press.
- Olanow CW, Arendash GW. Metals and free radicals in neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurol.* **1994**; 7:548-58.

- Omar SH. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi. Pharm. J.* **2010**; 18:111-121.
- Orama M, Tilus P, Taskinen J, Lotta T. Iron(III)-Chelating Properties of the Novel Catechol O-Methyltransferase Inhibitor Entacapone in Aqueous Solution. *J. Pharma. Sci.* **1997**; 86:827-31.
- Ozyener F, Çetinkaya M, Alkan T, Gören B, Kafa IM, Kurt MA, Koksai N. Neuroprotective effects of melatonin administered alone or in combination with topiramate in neonatal hypoxic-ischemic rat model. *Restor Neurol. Neurosci.* **2012**; 30:435-444.
- Paiva-Martins F, Silva A, Almeida V, Carvalheira M, Serra C, Rodrigues-Borges JE, Fernandes J, Belo L, Santos-Silva A. Protective activity of hydroxytyrosol metabolites on erythrocyte oxidative-induced hemolysis. *J. Agric. Food Chem.* **2013**; 61:6636-6642.
- Palmer AM, Alavijeh MS. Overview of experimental models of the blood-brain barrier in CNS drug discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2013**; 62:7.15.1-7.15.30.
- Panizzi L, Searpati ML, Oriente G. The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of the olive with hypotensive action. *Il, Gazz. Chim. Ital.* **1960**; 90:1449-1485.
- Papadopoulos G, Boskou D. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**; 68:669-671.
- Papavasiliou PS, Cotzias GC, Duby SE, Steck AJ, Fehling C, Bell MA. Levodopa in parkinsonism: potentiation of central effects with a peripheral inhibitor. *N. Engl. J. Med.* **1972**; 286:8-14.
- Parada A, Soares-Da-Silva P. BIA 3-202, a novel catechol-O-methyltransferase inhibitor, reduces the peripheral O-methylation of L-DOPA and enhances its availability to the brain. *Pharmacol.* **2003**; 68:29-37.
- Parashos SA, Wielinski CL, Kern JA. Frequency, Reasons, and Risk Factors of Entacapone Discontinuation in Parkinson Disease. *Clin. Neuropharmacol.* **2004**; 27:119-123.
- Paredes C, Cegarra J, Roig A, Sánchez-Monedero MA, Bernal MP. Characterization of olive mill wastewater (alpechín) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technol.* **1999**; 67: 111-115.
- Parkinson L, Keast R. Oleocanthal, a Phenolic Derived from Virgin Olive Oil: A Review of the Beneficial Effects on Inflammatory Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**; 15:12323-12334.
- Pauwels EKJ. The Mediterranean diet, part III: Compounds, components and considerations in relation to the risk of type 2 diabetes. *Drugs Fut.* **2009**; 34:903-909.
- Pawlas N, Nierwińska K, Stolecka A, Gabryel B, Pudełko A, Matecki A. Effects of N-acetylcysteine and ebselen on arachidonic acid release from astrocytes and neurons cultured in normoxic or simulated ischemic conditions. *Pharmacol. Rep.* **2009**; 61:941-946.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego. **1986**.
- Pelucchi C, Bosetti C, Rossi M, Negri E, La Vecchia C. Selected aspects of Mediterranean diet and cancer risk. *Nutr. Cancer.* **2009**; 61:756-766.
- Pentikäinen MO, Lindstedt KA, Kovanen PT. Inhibition of the oxidative modification of LDL by nitecapone. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1995**; 15:740-746.
- Pereira-Caro G, Madrona A, Bravo L, Espartero JL, Alcudia F, Cert A, Mateos R. Antioxidant activity evaluation of alkyl hydroxytyrosyl ethers, a new class of hydroxytyrosol derivatives. *Food Chem.* **2009**; 115:86-91.

## 8. Bibliografía

- Pereira-Caro G, Mateos R, Saha S, Madrona A, Espartero JL, Bravo L, Kroon PA. Transepithelial transport and metabolism of new lipophilic ether derivatives of hydroxytyrosol by enterocyte-like Caco-2/TC7 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2010a**; 58:11501-11509.
- Pereira-Caro G, Bravo L, Madrona A, Espartero JL, Mateos R. Uptake and metabolism of new synthetic lipophilic derivatives, hydroxytyrosyl ethers, by human hepatoma HepG2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2010b**; 58:798-806.
- Pereira-Caro G, Sarria B, Madrona A, Espartero JL, Escuderos ME, Bravo L, Mateos R. Digestive stability of hydroxytyrosol, hydroxytyrosyl acetate and alkyl hydroxytyrosyl ethers. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2012**; 63:703-707.
- Pérez-Jiménez F, Álvarez de Cienfuegos G, Badimon L, Barja G, Battino M and Blanco A. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur. J. Clin. Invest.* **2005**; 35: 421-424.
- Pérez-Jiménez J, Hubert J, Hooper L, Cassidy A, Manach C, Williamson G, Scalbert A. Urinary metabolites as biomarkers of polyphenols intake in humans: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**; 92:801-809.
- Perez-Vizcaino F, Duarte J, Santos-Buelga C. The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *Sci. Food Agric.* **2012**; 92:1822-5.
- PerrinJaquet-Mocchetti T, Busjahn A, Schmidlin C, Schmidt A, Bradl B, Aydogan C. Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phytother. Res.* **2008**; 22:1239-1242.
- Piersanti G, Retini M, Espartero JL, Madrona A, Zappia G. An efficient, economical synthesis of hydroxytyrosol and its protected forms via Baeyer-Villiger oxidation. *Tetrahedron. Lett.* **2011**; 52:4938-4940.
- Piskula M, Terrao J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.* **1998**; 128:1172-1178.
- Pokorny J. Major factors affecting the antioxidant of lipids. In: Chan, H.W.S., ed. Autoxidation of unsaturated lipids. London, Academic Press. **1987**; 141-206.
- Porter W, Black ED, Drolet AM. Use of a polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: Contrast in relative effectiveness of antioxidant in bulk versus dispersed systems. *J. Agric. Food Chem.* **1989**; 37:615-624.
- Poudyal, H., Campbell, F., Brown, L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J. Nutr.* **2010**; 140:946-953.
- Povie G, Villa G, Ford L, Pozzi D, Schiesser CH, Renaud P. Role of catechol in the radical reduction of B-alkylcatecholboranes in presence of methanol. *Chem. Commun.* **2010**; 46:803-805.
- Prabhakar O. Cerebroprotective effect of resveratrol through antioxidant and anti-inflammatory effects in diabetic rats. *Naunyn Sch. Arch. Pharmacol.* **2013**; 386:705-10.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified Ferric Reducing/Antioxidant Power assay. *J. Agric. Food Chem.* **2000**; 48:3396-3402.
- Pystynen J, Ovaska M, Vidgren J, Lotta T, Yliperttulaikonen M. Coumarin derivatives with COMT inhibiting activity. WO2002/02548 A1. **2002**.
- Quiles JL, Farquharson AJ, Simpson DK, Grant I, Wahle KWJ. Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br. J. Nutr.* **2002**; 88:225-234.

- Ramírez-Tortosa MC, Urbano G, López-Jurado M, Nestares T, Gómez MC, Mir A, Ros E, Mataix J, Gil A. Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *J. Nutr.* **1999**; 129:2177-2183.
- Re R, Pellegrini N, Proteffente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**; 26:1231-1237.
- Rees K, Hartley L, Flowers N, Clarke A, Hooper L, Thorogood M, Stranges S. Mediterranean' dietary pattern for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2013**; 8:1-53.
- Reyes JJ, De la Cruz JP, Muñoz-Marín J, Guerrero A, Lopez-Villodres JA, Madrona, A, Espartero JL, Gonzalez-Correa JA. Antiplatelet effect of new lipophilic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives in human blood. *Eur. J. Nutr.* **2013**; 52:591-599.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**; 20:933-956.
- Richard N, Arnold S, Hoeller U, Kilpert C, Wertz K, Schwager J. Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta Med.* **2011**; 77:1890-1897.
- Rodríguez G, Lama A, Trujillo M, Espartero JL, Fernández-Bolaños J. Isolation of a powerful antioxidant from *Olea Europea* fruit-mill waste: 3,4-dihydroxyphenylglycol. *LWT-Food Sci. Technol.* **2009**; 42:483-490.
- Rodríguez-Gutiérrez G, Duthie GG, Wood S, Morrice P, Nicol F, Reid M, Cantlay LL, Kelder T, Horgan GW, Fernández-Bolaños Guzmán J, De Roos B. Alperujo extract, hydroxytyrosol, and 3,4-dihydroxyphenylglycol are bioavailable and have antioxidant properties in vitamin E-deficient rats—a proteomics and network analysis approach. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**; 56, 1131-1147.
- Romero C, Medina E, Vargas J, Brenes M, de Castro A. In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J. Agric. Food Chem.* **2007**; 55: 680-686.
- Rouben IF, Embree LJ. Post mortem stability of catecholamines in discrete regions of rat brain. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1979**; 23:143-53.
- Ruano J, López-Miranda J, Fuentes F, Moreno JA, Bellido C, Pérez-Martínez P, Lozano A, Gómez P, Jiménez Y, Pérez-Jiménez F. Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2005**; 46:1864-1868.
- Ruano J, López-Miranda J, de la Torre R, Delgado-Lista J, Fernández J, Caballero J, Covas MI, Jiménez Y, Pérez-Martínez P, Marín C, Fuentes F, Pérez-Jiménez F. Intake of phenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients. *J. Clin. Nutr.* **2007**; 86:341-346.
- Rubió L, Valls RM, Maciá A, Pedret A, Giral M, Romero MP, De La Torre R, Covas MI, Solà R, Motilva MJ. Impact of olive oil phenolic concentration on human plasmatic phenolic metabolites. *Food Chem.* **2012**; 135:2922-9.
- Rubió L, Serra A, Maciá A, Piñol C, Romero MP, Motilva MJ. In vivo distribution and deconjugation of hydroxytyrosol phase II metabolites in red blood cells: A potential new target for hydroxytyrosol. *J. Funct. Foods.* **2014**; 10:139-143.
- Ruiz MI. Importancia de los grupos hidroxilos en el efecto antioxidante y neuroprotector de algunos derivados de los polifenoles del aceite de oliva. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga, **2013**.

## 8. Bibliografía

- Sahota, P, Savitz, S.I. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery. *Neurotherapeutics*. **2011**; 8:434-451.
- Salvini S, Sera F, Caruso D, Giovannelli L, Visioli F, Saieva C, Masala G, Ceroti M, Giovacchini V, Pitozzi V, Galli C, Romani A, Mulinacci N, Bortolomeazzi R, Dolara P, Palli D. Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br. J. Nutr.* **2006**; 95:742-751.
- Santiago M, Westerink BHC, Characterization of the in vivo release of dopamine as recorded by different types of intracerebral micro-dialysis probes. *Naunyn Sch. Arch. Pharmacol.* **1990**; 342:407-414.
- Santiago M, Machado A, Cano J. Validity of a quantitative technique to study striatal dopaminergic neurodegeneration by in vivo microdialysis. *J. Neurosci. Methods*. **2001**; 108:181-187.
- Sarriá B, Mateos R, Gallardo E, Ramos S, Martín MÁ, Bravo L, Goya L. Nitroderivatives of olive oil phenols protect HepG2 cells against oxidative stress. *Food Chem. Toxicol.* **2012**; 50:3752-8.
- Sayre LM, Smith MA, Perry G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr. Med. Chem.* **2001**; 8:721-738.
- Scarmeas N, Stern Y, Tang MX, Mayeux R, Luchsinger JA. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **2006**; 59:912-921.
- Schaffer S, Podstawa M, Visioli F, Bogani P, Muller WE, Eckert GP. Hydroxytyrosol rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and ex vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2007**; 55: 5043-5049.
- Scheller EF. Treatment of hypertension with standardized olive leaf extract. *Med. Klin.* **1955**; 50: 327-329.
- Schultz E, Nissinen E. Inhibition of rat liver and duodenum soluble catechol-O-methyltransferase by a tight-binding inhibitor OR-462. *Biochem. Pharmacol.* **1989**; 38:3953-3956.
- Sedek G, Jorga K, Schmitt M, Burns RS, Leese P. Effect of tolcapone on plasma levodopa concentrations after coadministration with levodopa/carbidopa to healthy volunteers. *Clin. Neuropharmacol.* **1997**; 20:531-554.
- Serra A, Rubió L, Borràs X, Macià A, Romero MP, Motilva MJ. Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. **2012**. *Mol. Nutr. Food Res.* 56:486-496.
- Servili M, Baldioli M, Miniati E, Montedoro G. Antioxidant activity of new phenolic compounds extracted from virgin olive oil and their interaction with  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* **1996**; 73:55-60.
- Shahidi F, Zhong Y. Revisiting the polar paradox theory: a critical overview. *J. Agric. Food Chem.* **2011**; 59:3499-3504.
- Siebrecht P. Food products containing an olive extract. Ger. **2008**. WO2007EP08673 20071005.
- Siriani R, Chimento A, De Luca A, Casaburi I, Rizza P, Onofrio A, et al. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**; 54:833-840.
- Smeyne M, Smeyne RJ. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free. Rad. Bio. Med.* **2013**; 62:13-25.
- Smythies J. Redox aspects of signaling by catecholamines and their metabolites. *Antioxid. Redox Signal.* **2000**; 2:575-583.

- Soler A, Romero MP, Macià A, Saha S, Furniss CSM, Kroon PA, Motilva MJ. Digestion stability and evaluation of the metabolism and transport of olive oil phenols in the human small-intestinal epithelial Caco-2/TC7 cell line. *Food Chem.* **2010**; 119:703-714.
- Solinas M, Di Giovacchino L, Mascolo A. The polyphenols of olives and olive oil. Note III: influence of temperature and kneading time on the oil polyphenol content. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* **1978**; 55:19-23.
- Solinas M. HRGC analysis of phenolic components in virgin olive oils in relation to the ripening and the variety of olives. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* **1987**; 64:255-262.
- Suárez M, Valls RM, Romero MP, Macià A, Fernández S, Giralte M, Solà R, Motilva MJ. Bioavailability of phenols from a phenol-enriched olive oil. **2011**. *Brit. J. Nutr.* 106:1691-1701.
- Susalit E, Agus N, Effendi I, Tjandrawinata RR, Nofiarny D, Perrinjaquet-Mocchetti T, et al. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with captopril. *Phytomedicine.* **2011**; 18: 251–258.
- Suttar, J., Masova, L., Dyr, E.. Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2001**; 751:193-197.
- Suzuki YJ, Tsuchiya M, Safadi A, Kagan VE, Packer L. Antioxidant properties of nitecapone (Or-462). *Free Rad. Biol. Med.* **1992**; 13:517-525.
- Tabera J, Guinda A, Ruiz-Rodríguez A, Señoráns FJ, Ibáñez E, Albi T, Reglero G. Countercurrent Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of High-Added-Value Compounds from a Hexane Extract of Olive Leaves. *J. Agric. Food Chem.* **2004**; 52:4774-9
- Tammela P, Laitinen L, Galkin A, Wennberg T, Heczko R, Vuorela H, Slotte JP, Vuorela P. Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipids vesicles. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**; 425:93-9.
- Tenhunen J, Salminen M, Lundstrom K, Kiviluoto T, Savolainen R, Ulmanen I. Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur. J. Biochem.* **1994**; 223:1049-1059.
- Toledo E, Hu FB, Estruch R, Buil-Cosiales P, Corella D, Salas-Salvadó J, Covas MI, Arós F, Gómez-Gracia E, Fiol M, Lapetra J, Serra-Majem L, Pinto X, Lamuela-Raventós RM, Saez G, Bulló M, Ruiz-Gutiérrez V, Ros E, Sorli JV, Martínez-González MA. Effect of the Mediterranean diet on blood pressure in the PREDIMED trial: results from a randomized controlled trial. *BMC Med.* **2013**; 11:207-210.
- Tomás-Barberán FA, Andrés-Lacueva C. Polyphenols and health: current state and progress. *J. Agric. Food Chem.* **2012**; 60:8773-5.
- Torres A, Penalver P, Rondon D, Morales JC. Efficient lipase-catalyzed synthesis of new lipid antioxidants based on a catechol structure. *Tetrahedron.* **2005**; 61:7654-7660.
- Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr. Res. Rev.* **2005**; 18:98-112.
- Trujillo M, Mateos R, Collantes L, Espartero JL, Cert R, Jover M, Alcuía F, Bautista J, Cert A, Parrado J Lipophilic hydroxytyrosyl esters. Antioxidant activity in lipid matrices and biological systems. *J. Agric. Food Chem.* **2006**; 54:3779-3785.
- Tsimidou M, Papadopoulos G, Boskou D. Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by RP-HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chem.* **1992**; 44:53-60.

## 8. Bibliografía

- Tuck KL, Freeman MP, Hayball PJ, Strecht GL, Stupans I. The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral doses of labeled compounds to rats. *J. Nutr.* **2001**; 131:1993-1996.
- Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil; metabolism and health effects. *J. Nutr. Biochem.* **2002a**; 13:636-644.
- Tuck KL, Hayball PJ, Stupans I. Structural characterization of the metabolites of hydroxytyrosol, the principal phenolic component in olive oil, in rats. *J. Agric. Food Chem.* **2002b**; 50:2404-2409.
- Turkey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2000**; 40:581-616.
- Uрпи-Sarda M, Casas R, Chiva-Blanch G, Romero-Mamani ES, Valderas-Martínez P, Salas-Salvadó J, Covas MI, Toledo E, Andres-Lacueva C, Llorach R, García-Arellano A, Bulló M, Ruiz-Gutiérrez V, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. The Mediterranean diet pattern and its main components are associated with lower plasma concentrations of tumor necrosis factor receptor 60 in patients at high risk for cardiovascular disease. *J. Nutr.* **2012**; 142:1019-1025.
- Valls-Pedret C, Lamuela-Raventós RM, Medina-Remón A, Quintana M, Corella D, Pintó X, Martínez-González MA, Estruch R, Ros E. Polyphenols-rich foods in the mediterranean diet are associated with better cognitive function in elderly subjects at high cardiovascular risk. *J. Alzheimer Dis.* **2012**; 29:773-782.
- Vázquez A, Janer C, Janer ML. Polifenoles naturales y estabilidad del aceite de oliva. *Grasas y Aceites.* **1975**; 26:14-18.
- Vázquez A. Polyphenols of olive oil and their effect on its characteristics. *Rev. Fr. Corps Gras.* **1978**; 25: 21-26.
- Villalobos MA, De La Cruz JP, Carrasco T, Smith-Agreda JM, Sánchez de la Cuesta F. Effects of alpha-tocopherol on lipid peroxidation and mitochondrial reduction of tetraphenyl tetrazolium in the rat brain. *Brain Res. Bull.* **1994**; 33:313-318.
- Villalobos MA, De La Cruz JP, Cuerda MA, Ortiz P, Smith-Agreda JM, Sánchez De La Cuesta F. Effect of S-adenosyl-L-methionine on rat brain oxidative stress damage in a combined model of permanent focal ischemia and global ischemia-reperfusion. *Brain Res.* **2000**; 883:31-40.
- Visioli F, Galli C. Olive oil phenols and their potential effects on human health. *J. Agric. Food Chem.* **1998**; 46:4292-4296.
- Visioli F, Caruso D, Galli C, Viappiani S, Galli G, Sala A. Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2000**; 278:797-799.
- Visioli F, Caruso D, Plasmati E, Patelli R, Mulinacci N, Romani A, Galli G, Galli C. Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose- dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic. Res.* **2001**; 34:301-305.
- Visioli F, Poli A, Galli C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.* **2002a**; 22:65-75.
- Visioli F, Galli C, Galli G, Caruso D. Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002b**; 104:677-684.
- Visioli F, Galli C, Grande S, Colonnelli K, Patelli C, Galli G, Caruso D. Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J. Nutr.* **2003**; 133:2612-2615.

- Visioli F, Bernardini E. Extra Virgin Olive Oil's Polyphenols: Biological Activities. *Current Pharm. Design.* **2011**; 17:786-804.
- Vissers MN, Zock PL, Wiseman SA, Meyboom S, Katan MB. Effect of phenol-rich extra virgin olive oil on markers of oxidation in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2001**; 55:334-341.
- Vissers MH, Zock PL, Roodenburg AJ, Leenen R, Katan MB. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J. Nutr.* **2002**; 132:409-417.
- Weinbrenner T, Fitó M, De La Torre R, Sáez G, Rijken P, Tormos C, Coolen S, Albadalejo MF, Abanades S, Schroder H, Marrugat J, Covas MI. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J. Nutr.* **2004**; 134:2314-2321.
- Wen X, Walle T. Methylation protects dietary flavonoids from rapid hepatic metabolism. *Xenobiotica.* **2006**; 36:387-397.
- Werdenberg D, Joshi R, Wolfram S, Merkle HP, Langguth P. Presystemic metabolism and intestinal absorption of antipsoriatic fumaric acid esters. *Biopharm. Drug Dispos.* **2003**; 24:259-273.
- Westerink BHC, Damsma G, Rollema H, De Vries JB, Horn AS. Scope and limitations of in vivo brain dialysis: a comparison of its application to various neurotransmitter systems. *Life Sci.* **1987**; 41:1763-1776.
- Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet.* **1994**; 344:793-795.
- Wolfe KL, Kang XM, He HJ, Dong M, Zhang QY, Liu, RH. Cellular antioxidant activity of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2008**; 24; 56:8418-8426.
- Wu YT, Lin LC, Tsai TH. Measurement of free hydroxytyrosol in microdialysates from blood and brain of anesthetized rats by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* **2009**; 1216:3501-3507.
- Yamada K, Ogawa H, Hara A, Yoshida Y, Yonezawa Y, Karibe K, Nghia VB, Yoshimura H, Yamamoto Y, Yamada M, Nakamura K, Imai K. Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Res.* **2009**; 83:35-44.
- Youdim MBH, Fridkin M, Zheng H. Novel bifunctional drugs targeting monoamine oxidase inhibition and iron chelation as an approach to neuroprotection in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *J. Neural. Transm.* **2004**; 111:1455-1471.
- Youdim MBH, Buccafusco JJ. CNS Targets for multi-functional drugs in the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases Review. *J. Neural. Transm.* **2005**; 112:519-537.
- Zamora-Ros R, Serafini M, Estruch R, Lamuela-Raventós RM, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Fiol M, Lapetra J, Arós F, Covas MI, Andres-Lacueva C; PREDIMED Study Investigators. Mediterranean diet and non enzymatic antioxidant capacity in the PREDIMED study: evidence for a mechanism of antioxidant tuning. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2013**; 23:1167-1174.
- Zhou C, Huang Y, Przedborska S. Oxidative stress in Parkinson's disease. A mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann. N. Acad. Sci.* **2008**; 1147:93-104.
- Zoric N, Horvat I, Kopjar N, Vucemilovic A, Kremer D, Tomic S, et al. Hydroxytyrosol Expresses Antifungal Activity In Vitro. *Current Drug Targets.* **2013**; 14:992-998.



## 9. ANEXOS



### 9.1. Anexo 1. Entidades que participan en la Tesis Doctoral

El trabajo experimental se ha realizado en centros de investigación de reconocido prestigio y que se detallan a continuación:

- ✓ La preparación de los nuevos nitrocatecoles derivados de hidroxitirosol ha sido realizada en el Dpto. de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia en la Universidad de Sevilla.
- ✓ El estudio de la actividad antioxidante *in vitro* de los derivados lipofílicos de nitrohidroxitirosilo, así como los estudios de metabolismo y biodisponibilidad de nitrohidroxitirosol, acetato de nitrohidroxitirosilo y éter etílico de nitrohidroxitirosilo a nivel intestinal y hepático, han sido desarrollados en el Dpto. de Metabolismo y Nutrición del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC).
- ✓ El estudio de la actividad antioxidante y neuroprotectora de nitrohidroxitirosol, acetato de nitrohidroxitirosilo y éter etílico de nitrohidroxitirosilo, en modelos experimentales de daño cerebral, ha sido realizado en el Dpto. de Farmacología y Pediatría de la Facultad de Medicina en la Universidad de Málaga.
- ✓ El estudio de la capacidad inhibidora de nitrohidroxitirosol, acetato de nitrohidroxitirosilo y éter etílico de nitrohidroxitirosilo sobre la actividad de la enzima COMT, ha sido desarrollado en el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia en la Universidad de Sevilla.



## 9.2. Anexo 2. Financiación Proyecto P09-AGR-5098

La realización del presente trabajo se ha llevado a cabo en el marco del proyecto de Investigación de Excelencia de la Junta de Andalucía titulado '*APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA OLIVARERA. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS ANTIOXIDANTES CON POTENCIAL APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DEL PARKINSON*' (P09-AGR-5098) y con la concesión a Elena Gallardo Morillo de una beca Predoctoral según la Resolución de convocatoria de 24 de febrero de 2010 (BOJA nº 44, de 5 de marzo de 2010).



## 9.3. Anexo 3. Producción científica relacionada con la Tesis Doctoral

### 9.3.1. Publicaciones a revistas científicas



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Food and Chemical Toxicology

Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)



---

**Nitroderivatives of olive oil phenols protect HepG2 cells against oxidative stress**

Beatriz Sarriá<sup>a,\*</sup>, Raquel Mateos<sup>a</sup>, Elena Gallardo<sup>b</sup>, Sonia Ramos<sup>a</sup>, María Ángeles Martín<sup>a</sup>, Laura Bravo<sup>a</sup>, Luis Goya<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), José Antonio Nováis 10, 28040 Madrid, Spain  
<sup>b</sup>Department of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Sevilla, Spain

---

<p><b>ARTICLE INFO</b></p> <p><i>Article history:</i>          Received 12 June 2012          Accepted 17 July 2012          Available online 27 July 2012</p> <p><i>Keywords:</i>          Antioxidant defenses          Dietary antioxidants          Nitrocatechols          Olive oil phenols          Reactive oxygen species</p>	<p><b>ABSTRACT</b></p> <p>A series of nitroderivatives has been synthesized from natural and synthetic olive oil phenols to increase the assortment of compounds with a putative effect against Parkinson disease. Before considering the potential therapeutical and nutraceutical applications of the new compounds it was critical to assess any cytotoxic effects in the liver. The precursor compounds of the nitroderivatives have shown oxidative stress protective effects, therefore we also assessed if the new compounds counteracted oxidative stress. The antioxidant activity of nitrohydroxytyrosol (NO-HTy), nitrohydroxytyrosyl-acetate (NO-HTy-A) and ethyl-nitrohydroxytyrosyl-ether (NO-HTy-E) at 5–20 μM for 20 h, as well as the protective effects of the nitroderivatives after 20 h against oxidative stress induced by <i>tert</i>-butylhydroperoxide (<i>t</i>-BOOH), were assessed in HepG2 cells. Direct treatment with the three nitroderivatives decreased ROS generation compared to the control and NO-HTy at 20 μM also increased glutathione peroxidase (GPx) activity (<math>p &lt; 0.001</math>). Pretreatment with the three nitroderivatives at 5–20 μM counteracted <i>t</i>-BOOH cell damage by decreasing ROS generation (<math>p &lt; 0.001</math>) and malondialdehyde (MDA) levels (<math>p &lt; 0.001</math>), increasing reduced glutathione (<math>p &lt; 0.001</math>) and diminishing GPx (<math>p &lt; 0.05</math>) activity. NO-HTy, NO-HTy-A and NO-HTy-E decreased glutathione reductase activity (<math>p &lt; 0.05</math>). Conclusion: the nitroderivatives do not present cytotoxic effects in the liver and in addition may protect against the oxidative stress involved in degenerative diseases.</p> <p style="text-align: right;">© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.</p>
--	--

---

**1. Introduction**

Nowadays, there is considerable interest in the cyto-protective effects of dietary compounds against oxidative stress and in the defense mechanisms involved. Natural dietary antioxidants have been given attention as possible therapeutic and preventative agents against free radicals as a tool to combat oxidative stress. Reactive oxygen species (ROS) accumulation in cellular components is the major factor causing molecular injury which ultimately leads to cell aging as well as other age-related degenerative diseases (Stagos et al., 2012). Oxidative stress is also the main cause of liver diseases and therefore plant therapeutic agents to combat liver damage present extreme importance (Stagos et al., 2012).

The phenolic fraction of virgin olive oil has proved to have antioxidant activity *in vitro*, scavenging peroxy radicals (Goya et al., 2007), other free radicals (Gordon et al., 2001) as well as reactive nitrogen species (De la Puerta et al., 2001), and also breaking peroxidative chain reactions and preventing metal ion catalyzed production of reactive oxygen species (Manna et al., 1997). Hydroxytyrosol (HTy) is considered one of the most abundant and representative olive oil phenols, present as secoiridoid derivative, as acetate ester and in free form (Mateos et al., 2005). The protective effect of HTy against oxidative stress-induced cytotoxicity has been systematically demonstrated (Goya et al., 2007; Martín et al., 2010a; Mateos et al., 2011). Moreover, current evidence strongly supports that natural biophenols may also offer indirect protection by increasing the endogenous antioxidant defense system (Masella et al., 2005). In fact, we have recently shown an additional mechanism of action of HTy to prevent oxidative stress damage in hepatic cells through the modulation of signaling pathways involved in antioxidant/detoxifying enzymes regulation (Martín et al., 2010a). This double mechanism of action confers HTy great chemo-protective potential to prevent oxidative stress-associated cell damage.

Nitrocatechols (Fig. 1), which are catechol *O*-methyltransferase (COMT) inhibitors, are a new class of bioactive compounds, being COMT an enzyme involved in the degradation of dopamine (Gordin et al., 2004; Bonifacio et al., 2007). Two catechol *O*-methyltransferase (COMT) inhibitors, entacapone and tolcapone, were developed

---

\* Corresponding authors. Tel.: +34 91 5445607 (B. Sarriá), tel.: +34 91 5445607 (L. Goya).  
 E-mail addresses: [bsarria@ictan.csic.es](mailto:bsarria@ictan.csic.es) (B. Sarriá), [lgoya@ictan.csic.es](mailto:lgoya@ictan.csic.es) (L. Goya).

0278-6915/\$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.030>



## In vivo striatal measurement of hydroxytyrosol, and its metabolite (homovanillic alcohol), compared with its derivative nitrohydroxytyrosol



Elena Gallardo<sup>a,1</sup>, Rocío Palma-Valdés<sup>a,1</sup>, José Luis Espartero<sup>a</sup>, Marti Santiago<sup>b,4</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Orgánica y Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain  
<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

### HIGHLIGHTS

- In vivo measurement of polyphenols by HPLC with electrochemical detection.
- Hydroxytyrosol produces high levels of homovanillic alcohol in the brain.
- Hydroxytyrosol crosses the blood brain barrier better than nitrohydroxytyrosol.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 April 2014  
 Received in revised form 3 July 2014  
 Accepted 21 July 2014  
 Available online 26 July 2014

#### Keywords:

Microdialysis  
 HPLC  
 Hydroxytyrosol  
 Homovanillic alcohol  
 Nitro-hydroxytyrosol  
 Rat's striatum

### ABSTRACT

Phenolic compounds were measured by in vivo brain microdialysis in rat striatum. Basal extracellular levels of hydroxytyrosol, homovanillic alcohol and nitro-hydroxytyrosol were not detectable by HPLC with electrochemical detection. However, systemic administration of hydroxytyrosol (20 and 40 mg/kg, i.p.) showed a clear increase in the extracellular level of this compound. This increase was accompanied by an increase in the extracellular level of homovanillic alcohol, a metabolite of hydroxytyrosol formed by catechol-O-methyltransferase activity. Perfusion of hydroxytyrosol (20 μM) through the microdialysis cannula also produced an increase in the extracellular level of homovanillic alcohol. Systemic administration of nitro-hydroxytyrosol (20 and 40 mg/kg, i.p.) produced a small increase in the extracellular level of this compound. Our data show that hydroxytyrosol is a more brain penetrant phenolic compound than nitro-hydroxytyrosol. Accordingly, there is high cerebral metabolism of hydroxytyrosol to produce homovanillic alcohol by catechol-O-methyltransferase activity, that is saturated at the higher administered dose of hydroxytyrosol.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Adherence to the so-called Mediterranean diet [1] is believed to provide protection against neurodegenerative disorders [2]. Olive oil is the main source of fat in the Mediterranean diet. It is rich in oleic acid, but also contains a wide range of 'minor constituents', like polyphenols that contribute to the stability of the oil and exhibit potent antioxidant properties [3,4]. Moreover, the beneficial effects of virgin olive oil consumption have been attributed in part to the

presence of phenolic compounds [5]. Owing to the properties of olive oil phenolic compounds, research should be directed not only towards the characterization and study of the bioactivity, but also towards revealing the bioavailability in order to gain new insight into their in vivo physiological behaviour. Therefore, the determination of virgin olive oil phenolic metabolites in brain samples is of relevance in order to understand how they cross the blood brain barrier and how they are metabolized. Hydroxytyrosol (HTy) that is presented as a secoiridoid derivative and to a lower extent as glucosylate and acetate derivatives is the most active phenolic compound in the olive oil [6].

In the present study we have used an in vivo microdialysis technique, which allows drug molecule sampling without depriving the subject of biological fluids, and subsequently involves minimal disturbance of physiological functions [7,8]. For brain drug pharmacokinetic studies, intracerebral microdialysis is the only

Abbreviations: HTy, hydroxytyrosol; HVAL, homovanillic alcohol; NO-HTy, nitro-hydroxytyrosol; COMT, catechol-O-methyl transferase; ip, intraperitoneal.

\* Corresponding author.

E-mail address: [msantiago@us.es](mailto:msantiago@us.es) (M. Santiago).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this report.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.07.037>  
 0304-3947/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## Synthesis and antioxidant activity of nitrohydroxytyrosol and its acyl derivatives

Mariana Trujillo, Elena Gallardo, Andrés Madrona, Laura Bravo, Beatriz Sarriá,  
 José Antonio González-Correa, Raquel Mateos, and José Luis Espartero

*J. Agric. Food Chem.*, Just Accepted Manuscript • DOI: 10.1021/jf503543x • Publication Date (Web): 29 Sep 2014

Downloaded from <http://pubs.acs.org> on October 2, 2014

### Just Accepted

"Just Accepted" manuscripts have been peer-reviewed and accepted for publication. They are posted online prior to technical editing, formatting for publication and author proofing. The American Chemical Society provides "Just Accepted" as a free service to the research community to expedite the dissemination of scientific material as soon as possible after acceptance. "Just Accepted" manuscripts appear in full in PDF format accompanied by an HTML abstract. "Just Accepted" manuscripts have been fully peer reviewed, but should not be considered the official version of record. They are accessible to all readers and citable by the Digital Object Identifier (DOI®). "Just Accepted" is an optional service offered to authors. Therefore, the "Just Accepted" Web site may not include all articles that will be published in the journal. After a manuscript is technically edited and formatted, it will be removed from the "Just Accepted" Web site and published as an ASAP article. Note that technical editing may introduce minor changes to the manuscript text and/or graphics which could affect content, and all legal disclaimers and ethical guidelines that apply to the journal pertain. ACS cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these "Just Accepted" manuscripts.

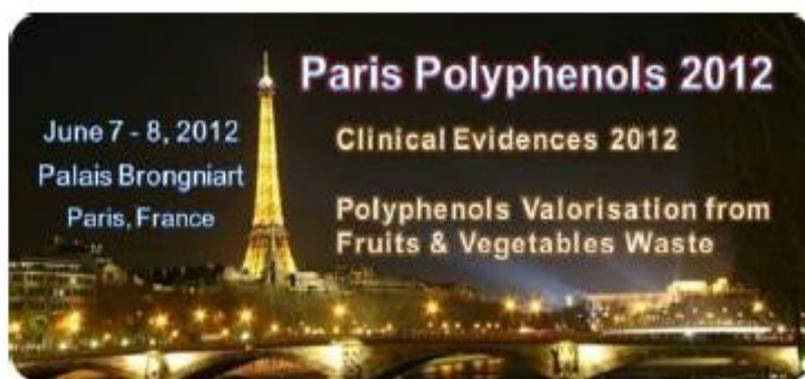
### 9.3.2. Comunicaciones a Congresos

*6<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols Applications*

## Paris Polyphenols 2012

6<sup>th</sup> International Conference on

## Polyphenols Applications



### Programme

Short Oral Presentations

Posters Accepted and Under Validation

June 7 & 8, 2012 – Paris, France



[www.polyphenols-site.com](http://www.polyphenols-site.com)

## ISANH POLYPHENOLS 2012 - PARIS - FRANCE

**METABOLISM OF NITRODERIVATIVES OF OLIVE OIL PHENOLS (HYDROXYTYROSOL AND HYDROXYTYROSYL ACETATE) AND ETHYL HYDROXYTYROSYL ETHER BY HUMAN HEPATOMA HEPG2 CELLS**ELENA GALLARDO,<sup>1,2</sup> BEATRIZ SARRIA,<sup>1</sup> JOSÉ L. ESPARTERO,<sup>2</sup> LAURA BRAVO,<sup>1</sup> RAQUEL MATEOS<sup>1</sup><sup>1</sup>Dep. of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), CSIC, Madrid, Spain.<sup>2</sup>Dep. of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain.

\*elegm@us.es

lrocatechols are compounds used to treat Parkinson disease due to their ability to inhibit catechol-O-methyltransferase (COMT), which is implied in the degradation of dopamine.<sup>1,2</sup> However, some of the actually available compounds on the market, tolcapone and entacapone, i.e., have showed hepatotoxicity activity and low efficacy, respectively.<sup>1</sup> In order to increase the assortment of these compounds with higher and safer therapeutic profile, nitroderivatives of certain natural olive oil phenols, hydroxytyrosol (HTy) and hydroxytyrosyl acetate (HTy-A), as well as a synthetic hydrophobic derivative of hydroxytyrosol, ethyl hydroxytyrosyl ether (HTy-E), have been synthesized.<sup>3</sup> Likewise, recent experiments have shown that these new nitroderivatives compounds present COMT's inhibitory activity, even higher than the commercially available COMT inhibitor,<sup>3</sup> and they are efficiently absorbed by Caco-2 cells (results in process), indicating their potential for hepatic transformation.

Accordingly, metabolism of nitrohydroxytyrosol (NO<sub>2</sub>HTy), nitrohydroxytyrosyl acetate (NO<sub>2</sub>HTy-A) and ethyl nitrohydroxytyrosyl ether (NO<sub>2</sub>HTy-E) was evaluated in human hepatoma cells (HepG2) in culture, as a model system of the human liver. Every compound was incubated for 2 and 18 hours with HepG2 cells, and LC-DAD in addition to HPLC-MS were used to identify metabolites in culture media, cell lysates, as well as in these samples after hydrolysis with  $\beta$ -glucuronidase and sulfatase. In vitro conjugation reactions of pure nitroderivatives were also carried out.

The results showed an extensive uptake and metabolism by HepG2 cells after 18h of incubation in comparison with Caco-2 cells. NO<sub>2</sub>HTy-A was extensively hydrolyzed into NO<sub>2</sub>HTy being subsequently transformed in nitrohydroxytyrosyl metabolites, while NO<sub>2</sub>HTy-E remained without hydrolyzing into the free form. High amount of glucuronides followed by methylglucuronides together with low amounts of methyl conjugates, were the metabolites mainly detected after the incubation of the evaluated compounds with HepG2 cells.

**conclusion**, nitroderivatives of HTy, HTy-A and HTy-E can be up-taken and metabolized by the liver as suggested by the results obtained using HepG2 cells as a hepatic model system.

ordin, A.; Kaakkola, S.; Tervainen, H. *J. Neural Transm.*, 111, 1343-1363, 2004.

Infacio, M.J.; Palma, P.N.; Almeida, L.; Soares P. *CNS Drugs*, 13, 352-379, 2007.

Gallardo-Morillo, E.; Trujillo, M.; Santiago, M.; Madrona, A.; Palma, R.; Espartero, J.L. *Basic Clin. Pharm. Toxicol.*, 109, 48-48, 2011.

**PREPARATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY EVALUATION OF  
NITROHYDROXYTYROSYL ESTERS**

MARIANA TRUJILLO,<sup>1</sup> ELENA GALLARDO<sup>1,2</sup> ROCIO PALMA,<sup>1</sup> BEATRIZ SARRIA,<sup>2</sup> LAURA BRAVO,<sup>2</sup> RAQUEL MATEOS,<sup>2</sup> JOSÉ L. ESPARTERO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dep. of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain

<sup>2</sup> Dep. of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), CSIC, Madrid, Spain

\*elegm@us.es

Hydroxytyrosol (HTy), the major phenolic compound in virgin olive oil, presents numerous beneficial health properties. Recent studies have also shown that this biophenol protects against oxidative stress in Caco-2 cells<sup>1</sup> and HepG2 cells<sup>2</sup> by scavenging several free radical species. However, HTy is barely soluble in lipophilic media. The food industry demands the development of lipophilic antioxidants that in addition can be used as functional ingredients in food matrices. Bearing this mind, new lipophilic derivatives of HTy with potential antioxidant activity have been designed and synthesized.<sup>3,4</sup>

Recently, alternative HTy derivatives have been proposed and synthesized.<sup>5</sup> These new derivatives have in common that they contain a nitro group in the molecule of hydroxytyrosol. Nevertheless, the combination of the presence of the nitro group and the length of the side chain could affect the antioxidant capacity of these compounds. Therefore, the objective of the present study was to prepare a series of lipophilic nitrohydroxytyrosyl esters (from 2 to 16 carbon atoms) in order to evaluate their antioxidant activity using different methods, such as FRAP, ABTS and ORAC assays. Results will be shown.

- 1 Rodríguez-Ramiro, I.; Marín, M.A.; Ramos, S.; Bravo, L.; Goya, L. *Toxicol.*, 268, 43-48, 2011.
- 2 Mateos, R.; Goya, L.; Bravo, L. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9897-9905, 2005.
- 3 Alcuía, F.; Cert, A.; Espartero, J.L.; Mateos, R.; Trujillo, M. *PCT Int. Appl.*, WO 2004005237, 2004.
- 4 Trujillo, M.; Mateos, R.; Collantes, L.; Espartero, J.L.; Cert, R.; Jover, M.; Alcuía, F.; Bautista, J.; Cert, A.; Parrado, J. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3779-3785, 2006.
- 5 Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Mateos, R.; Rodríguez, G.; Trujillo, M.; Fernández-Bolanos, J.; Espartero, J. L. *Molecules*, 14, 1762-1772, 2009.
- 6 Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Bravo, L.; Espartero, J. L.; Alcuía, F.; Cert, A.; Mateos, R. *Food Chem.*, 115, 86-91, 2008.
- 7 Gallardo-Monillo, E.; Trujillo, M.; Santiago, M.; Madrona, A.; Palma, R.; Espartero, J.L. *Basic Clin. Pharm. Toxicol.*, 109, 48-48, 2011.

*7<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols Applications*



### TRANSEPIHELIAL TRANSPORT AND METABOLISM OF NITRODERIVATIVES OF HYDROXYTYROSOL BY HUMAN INTESTINAL CACO-2 CELL MONOLAYERS

ELENA GALLARDO<sup>1,2</sup>, BEATRIZ SARRIA<sup>1</sup>, JOSÉ LUIS ESPARTERO<sup>2</sup>, LAURA BRAVO<sup>1</sup>, RAQUEL MATEOS<sup>1</sup>.

1) Dep. of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN). CSIC, Madrid. Spain.

2) Dep. of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain.

[elegm@us.es](mailto:elegm@us.es)

Nitroderivatives of natural olive oil phenols, hydroxytyrosol (HT) and hydroxytyrosyl acetate (HT-A), as well as of a synthetic hydrophobic derivative of hydroxytyrosol, ethyl hydroxytyrosyl ether (HT-E), have been synthesized in order to increase the assortment of compounds with putative effects against Parkinson disease<sup>1,2</sup>. These phenolic compounds have already shown some COMT's inhibitory activity in preliminary studies<sup>3</sup>, which play an important role in the metabolism of dopamine in Parkinson disease. Likewise, these new compounds are able to protect against oxidative stress which might be involved in other degenerative disorders<sup>4</sup>.

The transport and metabolism of nitrohydroxytyrosol (NO<sub>2</sub>HT), nitrohydroxytyrosyl acetate (NO<sub>2</sub>HT-A) and ethyl nitrohydroxytyrosyl ether (NO<sub>2</sub>HT-E) were evaluated using a two-compartment transwell system containing differentiated Caco-2 cell monolayers, which simulates the intestinal barrier. Nitroderivatives were loaded apically (AP) and basolaterally (BL) in order to evaluate their apparent permeability coefficient (P<sub>app</sub>, cm/s) and Papp ratio (P<sub>app B→A</sub>/P<sub>app A→B</sub>). In addition, LC-DAD and LC-MS were used in conjunction with enzyme hydrolyses (sulfatase, beta-glucuronidase) reactions and in vitro conjugation reactions of pure nitroderivatives to identify metabolites.

The Papp ratios indicated that the three nitroderivatives were transferred across human Caco-2 cell monolayers, being NO<sub>2</sub>HT-A and NO<sub>2</sub>HT-E better absorbed than their precursor, NO<sub>2</sub>HT. Nitroderivatives were partially metabolized by intestinal epithelial cells. NO<sub>2</sub>HT was partially converted into glucuronidated and methylated conjugates. NO<sub>2</sub>HT-A was largely converted into free NO<sub>2</sub>HT and subsequently metabolized. Moreover, small amounts of glucuronidated NO<sub>2</sub>HT-A were also detected. NO<sub>2</sub>HT-E did not suffer hydrolysis into NO<sub>2</sub>HT although it was partially metabolized into glucuronidated conjugates.

In conclusion, nitroderivatives of HTy, HTy-A and HTy-E are well absorbed in Caco-2 cell, and in addition they are partially metabolized, dependent on their lipophilic nature.

#### References

- Gordin, A.; Kaakkola, S.; Teravainen, H. *J. Neur. Transm.*, 111, 1343-1363, 2004.
- Bonifacio, M.J., Palma, P.N.; Almeida, L., Soares, P. *CNS Drugs*, 13, 352-379, 2007.
- Gallardo-Morillo, E.; Trujillo, M.; Santiago, M.; Madrona, A.; Palma, R.; Espartero, J.L. *Basic Clin. Pharm. Toxicol.*, 109, 48-48, 2011.
- Sarría, B.; Mateos, R., Gallardo, E., Ramos, S., Martín, M.A., Bravo, L., Goya, L. *Food Chem. Toxicol.*, 50, 3752-3758, 2012.

## XXXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacología

## XXXIII Congress of the Spanish Society Pharmacology Málaga, October 3–5, 2011

**Honorary Committee**

S.M. el Rey de España, Juan Carlos I

Excmo. Sra. Dña. Cristina Garmendia Mendizábal – Ministra de Ciencia e Innovación

Excmo. Sr. D. Ángel Gabilondo Pujol – Ministro de Educación

Excmo. Sra. Dña. Leire Pajín Iraola – Ministra de Sanidad, Política Social e Igualdad

Excmo. Sra. Dña. María Jesús Montero Cuadrado – Consejera de Salud de la Junta de Andalucía

Ilmo. Sr. D. Elías Bendodo Benasayag – Presidente de la Diputación Provincial de Málaga

Excmo. Sr. D. Francisco de la Torre Prados – Alcalde de Málaga

Excmo. Sra. Dña. Adelaida de la Calle Martín – Rectora Magnífica de la Universidad de Málaga

Ilmo. Sr. D. Alfredo Blanes Berenguel – Decano de la Facultad de Medicina de Málaga

Ilma. Sra. Dña. M. Teresa Labajos Manzanares – Decana de la Facultad de Enfermería, Fisioterapia, Podología y Terapia Ocupacional

Sr. D. Juan José Rodríguez Sendín – Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Médicos de España

Sra. Dña. Carmen Peña López – Presidenta del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España

Sr. D. Miquel Molins Elizalde – Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Veterinarios de España

**Organizing Committee****President**

José Pedro De La Cruz Cortés

**Vicepresident**

Immaculada Bellido Estévez

**Secretary**

Elisa Isabel Márquez Romero

**Members**

Encarnación Blanco Reina, Yolanda Borráz Pereira, María del Rosario Cabello Porras, Nuria García-Agua Soler, Juan A. García Amés, Antonio J. García Ruiz, Antonio Garrido Toro, Ana Guerrero Loriguillo, Juan Antonio López Villodres, Elisa Martín Montañez, Francisco Martos Crespo, Javier Muñoz Marín, Juan de Pablo Molina, Aurelie Papineau, Raquel Perales Romero, Antonio Pino Blanes, Pastora Sánchez Ibarquien Mencos, Camilla Stephens, Eugenia Ulzurrun de Asanza y Vega

**Scientific Committee****President**

José Antonio González Correa

**Vicepresident**

José Aurelio Gómez Luque

**Secretary**

José Pavia Molina

**Members**

Pilar D'Ocon Navaza, Emili Esteve Sals, Julio Gálvez Peralta, Amadeu Gavaldá Monedero, Clara Fatra Giner, Teresa Millán Rusillo, Javier Pérez Frías, Elena Suárez González, Teresa Tejerina Sánchez, Mamel Vázquez Carrera

**Collaborating Institutions**

Diputación de Málaga, Fundación Española de Farmacología, Fundación General de la Universidad de Málaga, Universidad de Málaga, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (Junta de Andalucía), Ministerio de Innovación y Ciencia

**Sponsors**

Almirall, Amgem, Bioibérica, Grupo Ferrer, IGEN Biothech, Lilly, MSD, Novartis, Rottapharm, Roche, Rovi, Uriach

P59-03

## SYNTHESIS OF HYDROXYTYROSOL NITRODERIVATIVES AS COMT INHIBITORS

Gallardo-Montillo E.<sup>1</sup>, Trujillo M.<sup>1</sup>, Santiago M.<sup>2</sup>, Madrona A.<sup>1</sup>, Palma R.<sup>1</sup>, Esparetero J. L.<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Sevilla, Spain; <sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Sevilla, Spain

It is well known that hydroxytyrosol (HTy), a polyphenolic compound of virgin olive oil, shows a marked role as antioxidant in oxidative processes. Moreover, HTy has been shown to prevent oxidative injuries in animal models as well as HepG2 and Caco-2 cell lines. In the present study, we propose the synthesis of new antioxidant compounds derived from HTy. The aim of this study is to obtain nitroderivatives of HTy and to evaluate their antioxidant activities. In addition, it is known that several nitrotheol derivatives act as COMT inhibitors and, some of them are being now used in the Parkinson therapy. In this sense, NO<sub>2</sub>HTy, NO<sub>2</sub>HTyAc and EtNO<sub>2</sub>HTy were synthesized and purified by column chromatography. Optimum conditions were used for the synthetic process with acceptable overall yields. Further, COMT inhibition assay was carried out using five groups: healthy control (C), commercial RO-41 inhibitor (I), nitrohydroxytyrosol (NO<sub>2</sub>HTy), nitrohydroxytyrosyl acetate (NO<sub>2</sub>HTyAc) and ethyl nitrohydroxytyrosol (EtNO<sub>2</sub>HTy). Dopamine, DOPAC, and HVA levels in brain were measured by high performance liquid chromatography (HPLC). The findings demonstrated that Dopamine and DOPAC levels were significantly increased in nitrohydroxytyrosol group compared to control group and even, to commercial RO-41 inhibitor in the case of Dopamine. We could not achieve conclusive results for HVA.

**Conclusion:** The synthesis of nitroderivatives of HTy provides an approach as COMT inhibitors.

P60-03

## ANTIOXIDANT AND NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF 3,4-DIHYDROXYPHENYLGLYCOL IN RAT BRAIN SLICES

López-Leyva M. I.<sup>1</sup>, Muñoz-Marín J.<sup>2</sup>, Guerrero A.<sup>2</sup>, López-Villodres J. A.<sup>2</sup>, Guzmán-Moscoso R.<sup>1</sup>, Utrera A.<sup>1</sup>, Fernández-Bolaños J.<sup>2</sup>, González-Correa J. A.<sup>2</sup>, de la Cruz J. P.<sup>2</sup><sup>1</sup>School of Health Sciences, University of Malaga, Malaga, Spain; <sup>2</sup>LIAT Group, Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Malaga, Malaga, Spain; <sup>3</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Seville, Spain

Hydroxytyrosol, the most abundant polyphenol in virgin olive oil, has a clear antioxidant and neuroprotective effect, focusing on the first effect the main mechanism by which it exerts its effect on nerve tissue. These

(IC<sub>50</sub> μM: 68.9 ± 6.7 vs. 77.8 ± 5.6 for hydroxytyrosol). In the hypoxia reoxygenation model DHPG inhibited LDH efflux 32% with respect to control and hydroxytyrosol 72.3%. In this model TBARS was inhibited 6.7% with DHPG and a 59.7% with hydroxytyrosol. Although DHPG has antioxidant and neuroprotective effect, this effect is lower than the one with hydroxytyrosol.

P61-03

## IMPORTANCE OF TYPE-2 CYCLOOXYGENASE ACTIVITY INHIBITION IN NEUROPROTECTION

López-Villodres J. A.<sup>1</sup>, Guerrero A.<sup>1</sup>, Muñoz-Marín J.<sup>1</sup>, Guzmán-Moscoso R.<sup>2</sup>, López-Leyva M. I.<sup>2</sup>, Utrera A.<sup>2</sup>, de la Cruz J. P.<sup>1</sup>, González-Correa J. A.<sup>1</sup><sup>1</sup>LIAT Group, Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Malaga, Malaga, Spain; <sup>2</sup>School of Health Sciences, University of Malaga, Malaga, Spain

A neuroprotective effect of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) has been demonstrated, especially in neurodegenerative diseases. The cyclooxygenase (COX) activity has been related with neuronal damage. However the role of the two COX isoenzymes has not been elucidated. The aim of the study is to evaluate the importance of type-2 cyclooxygenase (COX-2) activity inhibition in neuroprotection. We used celecoxib as a selective COX-2 inhibitor, acetylsalicylic acid (ASA) as COX-1 inhibitor and ibuprofen as non selective COX1/2 inhibitor. We used an *in vitro* model of hypoxia-reoxygenation in rat hippocampus slices (n = 6 rats per group). After reoxygenation period we measured: LDH as indirect index of neuronal death, brain PGE<sub>2</sub> and brain interleukin 1beta and 10 as inflammatory mediators. Oxidative and nitrosative stress were defined by TBARS, GSH, GSSG, 3-nitrotyrosine and nitrite/nitrate production. The LDH efflux (IC<sub>50</sub> μM) values obtained after reoxygenation of brain slices were for ASA 929.2 ± 61.2, celecoxib: 8.93 ± 1.43 and ibuprofen 33.9 ± 13.1. The inflammatory mediator expressed as percentage respect to control obtained with neuroprotective IC<sub>50</sub> concentrations were as follows, PGE<sub>2</sub>: -79.1%, -10.4%, and -5.145% for ASA, celecoxib and ibuprofen respectively; IL 1β: +31%, -5.02% and -41.22%; IL 10: 0%, +18.63% and +10.25%. For the nitrosative stress: +27.1% for ASA, -52.5% for celecoxib and -36.54 for ibuprofen. The COX-2 inhibition seen not been the main mechanism for the neuroprotective effect of NSAID in this experimental model.

© 2011 The Authors

Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology © 2011 Nootic Pharmacological Society, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 109 (Suppl. 2), 31–66

XXXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacología



**BCPT**  
Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology  
www.bcpt.org

---

Volume 113 · Supplement 1 · September 2013

**Abstracts for the XXXIV Congress of the Spanish  
Society of Pharmacology**  
16–19 September 2013  
San Pedro del Pinatar (Murcia), Spain

**Disclaimer**

This abstract book has been produced using author-supplied copy. Editing has been restricted to some corrections of spelling and style where appropriate. No responsibility is assumed for any claims, instructions, methods or drug dosages contained in the abstracts: It is recommended that these are verified independently.

**WILEY**  
Blackwell

#### OLEUROPEIN SUPPRESSES ASSOCIATED-COLITIS COLORECTAL CARCINOGENESIS IN BALB/C MICE

Giner R.M., Giner E., Rios J.L., Redo M.C.

Departament de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València

**Introduction:** The chemoprevention by natural compounds is one of the emergent approaches to prevent/treat the appearance of CRC in patients with inflammatory bowel disease (IBD). Oleuropein, a phenolic secoiridoid, has demonstrated anti-inflammatory properties in IBD models (Giner et al, J Agric Food Chem, 2011, 59:12882–12892; Giner et al, Proc Br J Pharmacol Soc, 2012, 10:245), becoming a powerful candidate to test its effect on a model of CRC in mice.

**Materials and Methods:** CRC was induced by an intraperitoneal injection of 7.5 mg/kg of Azoxymethane (AOM) at day 0, followed at

used as anti-inflammatory agent in IBD.

#### P26-01 BIOAVAILABILITY AND METABOLISM OF NITRODERIVATIVES OF HYDROXYTYROSOL BY HUMAN CELL MODEL SYSTEMS

Gallardo E.<sup>1,2,3</sup>, Sarria B.<sup>1</sup>, Espadero J.L.<sup>2</sup>, González Correa J.A.<sup>3</sup>, De la Cruz Cortés J.P.<sup>3</sup>, Bravo L.<sup>1</sup>, Matens R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), CSIC, Madrid, Spain;

<sup>2</sup>Department of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain; <sup>3</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, School of Medicine, University of Malaga

© 2013 The Authors

Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology © 2013 Nordic Pharmacological Society. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 113 (Suppl. 1), 2–48

29

A series of nitroderivatives from natural olive oil phenols, hydroxytyrosol and hydroxytyrosyl acetate, as well as a synthetic hydrophobic derivative of hydroxytyrosol, ethyl hydroxytyrosyl ether, has been synthesized to increase the assortment of compounds with a putative effect against Parkinson disease. Recent experiments have shown that these nitroderivatives present COMT's inhibitory activity. Likewise, nitrohydroxytyrosol (NO2-HTy), nitrohydroxytyrosylacetate (NO2-HTy-A) and ethyl-nitrohydroxytyrosyl-ether (NO2-HTy-E) are also able to protect against oxidative stress which might be involved in other degenerative disorders. Because the *in vivo* biological activity of polyphenols is dependent on their intestinal uptake and metabolism, the absorption of these nitroderivatives and the extent to which they are conjugated and metabolized during transfer across Caco-2 cells, as a model system of intestinal barrier, was investigated. The results indicated that the three nitroderivatives were transferred across human Caco-2 cell monolayers, being NO2HT-A and NO2HT-E better absorbed than their precursor, NO2HT. A fraction of the absorbed compound remained unmetabolized which indicated the potential for hepatic transformation. Accordingly, metabolism of these compounds was evaluated in human hepatoma cells (HepG2) in culture, as a model system of the human liver. The results showed an extensive uptake and metabolism by HepG2 cells. NO2HT-A was extensively hydrolyzed into NO2HT being subsequently transformed in NO2HT metabolites, while NO2HT-E remained without hydrolyzing into the free form. In general, glucuronidated and methyl conjugates were the metabolites mainly detected. In conclusion, NO2HTy, NO2HTy-A and NO2HTy-E are well absorbed and partially metabolized during their intestinal passage. Therefore, nitroderivatives can be up-taken and extensively metabolized by the liver.

#### P27-01 ESTIMATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT IN SIDERITIS HYSSOPIFOLIA

Huerga-Mañanes V., Sierra-Vega M., García-Viñe J.J., Díez Llibana M.J., Sahagún-Prieto A.M., Martínez-Fernández M.N.

Pharmacology, Department of Biomedical Sciences, University of León, Spain

**Introduction:** Phenolic compounds of medicinal plants have beneficial effects against free radicals by acting as antioxidants. The aim of this study was to determine the total phenolic content of the ether, butanolic, methanol, water-butanol, chloroform and final aqueous extracts obtained from the aerial parts of *Sideritis hyssopifolia* using Folin-Ciocalteu colorimetric method.

**Material and methods:** The extracts were dissolved in 80% ethanol for analysis. Four hundred microlitres of extracts (100 µg/ml) were added to 2 ml of 1:10 diluted Folin-Ciocalteu reagent (2N). After 5 min of incubation, 1.6 ml of sodium carbonate solution (75 g/l) was added. The absorbance was determined at 765 nm, after 30 min of incubation at room temperature. Gallic acid (5–100 mg/l) was used for calibration of a standard curve.

**Results:** The results were expressed as milligram of gallic acid equivalents per gram of extracts (mgGAE/g extract). The values of total phenolic content obtained for the different extracts tested were: ether extract. –144.819 mgGAE/g extract; butanolic extract. –223.149 mgGAE/g extract; methanol extract. –105.593 mgGAE/g extract; aqueous butanolic extract. –45.409 mgGAE/g extract; chloroform extract. –11.988 mgGAE/g extract and final aqueous extract. –43.386 mgGAE/g extract.

**Conclusion:** We can conclude that the butanolic extract showed the highest total phenolic content, while the lowest was found in chloroform extract.

XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacología

Volume 115 · Supplement 3 · September 2014

# BCPT

**Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**

Abstracts for the XXXV Congress of the Spanish Society of Pharmacology

**Conferences**

**Oral Abstracts**

**Poster Abstracts**

**Author Index**



**WILEY**  
Blackwell

Sponsored by



**Material and Methods:** The study was carried out on two-month evolution diabetic rats induced with streptozotocin. Seven groups of rats ( $N = 12$  rats per group) were constituted: non diabetic rats (NDR), diabetic rats without treatment with HT (DR), and diabetic rats treated from the first day of diabetes with HT (0.5, 1, 2.5, 5 and 10 mg/kg/day po). At the end of the experimental follow up, some variables were determined: plasma concentration of oxidized LDL (oxLDL), malondialdehyde (MDA), reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG), VCAM-1 and myeloperoxidase (MPO).

**Results:** Plasma MDA was higher in DR than in NDR ( $0.27 \pm 0.03$  vs  $0.6 \pm 0.05$  nmol/mg prot.,  $P < 0.0001$ ); HT reduced MDA concentration with all the doses ( $P < 0.0001$ ). Both GSH and GSSG were not modified with HT administration ( $P > 0.1$ ). oxLDL concentration was higher in DR than in NDR ( $3.1 \pm 1.3$  vs  $21.8 \pm 2.1$  ng/mL,  $P < 0.0001$ ); HT reduced oxLDL concentration with all the doses ( $P < 0.0001$ ). VCAM-1 concentration was higher in DR than in NDR ( $0.3 \pm 0.03$  vs  $1.1 \pm 0.09$  ng/mL,  $P < 0.0001$ ); HT reduced VCAM-1 concentration with all the doses (45-55% inhibition  $P < 0.0001$ ). MPO concentration was higher in DR than in NDR ( $4.1 \pm 0.2$  vs  $12.3 \pm 1.2$  ng/mL,  $P < 0.0001$ ); HT reduced MPO concentration with all the doses (43-74% inhibition  $P < 0.0001$ ).

**Conclusions:** hydroxytyrosol reduced oxidative stress and inflammatory biomarkers in this experimental model.

#### 65 EFFECT OF NITRODERIVATIVES OF HYDROXYTYROSOL ON OXIDA STIVE STATUS AND CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE ACTIVITY IN RAT'S TISSUE

Gallardo E.<sup>1,2,3,4</sup>, Sarrago M.<sup>2</sup>, Páez R.<sup>1</sup>, Mateo R.<sup>4</sup>, Espartero J.L.<sup>1</sup>, De la Cruz J.P.<sup>1</sup>, González-Correa J.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo IIAIT, Depto. Farmacología, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Málaga; <sup>2</sup>Depto. de Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Seville; <sup>3</sup>Depto. of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Seville; <sup>4</sup>Depto. of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), CSIC, Madrid

**Objective:** To evaluate the antioxidant activity of nitrohydroxytyrosol (NO-HTy), nitrohydroxytyrosyl-acetate (NO-HTy-A) and ethyl nitrohydroxytyrosyl-ether (NO-HTy-E) after chemical damage in rat brain slices as well as the inhibition of catechol-O-methyl transferase (COMT) activity with a positive effect against Parkinson disease.

**Materials and Methods:** The protective effects of nitroderivatives against oxidative stress were studied *in vitro* in hippocampus rat brain slices by induction of *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BOOH) and ferrous salt. Moreover, the inhibition of COMT activity by HTy-nitroderivatives, free hydroxytyrosol and the commercial inhibitor RC-106590 was assessed through *ex vivo* study by intraperitoneal administration in rats with a single dose of 20 mg/kg for five days and hair measurement of intracellular dopamine and its metabolite levels in the corpus striatum by HPLC with electrochemical detection.

**Results:** The results indicated that oxidative variables were significantly changed in comparison to control samples after chemical damage. Treatment with the nitroderivatives and their precursor produced a decrease of ROS generation (with a maximum inhibition of 66% respect to induced control samples for NO-HTy-A) and malondialdehyde (MDA) (with a maximum inhibition of 73% respect to induced control samples for NO-HTy-E). Data also showed that intraperitoneal systemic administration produced a clear and statistically significant increase in the intracellular levels of dopamine and its metabolite, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (increase up to 50% respect to control samples).

**Conclusions:** The new nitroderivatives compounds, synthesized from natural olive oil phenol, hydroxytyrosol, show protective activity against oxidative stress as well as remarkable activity in the DOPAC and DA metabolism suggesting a positive effect against Parkinson disease.

#### 67 EFFECTS OF ANTHOCYANIDINS ON ASTROCYTES OVER OXIDATION MARKERS AND CELL INJURY INDUCED BY MPTP NEUROTOXIN

López Cid A., Carrotero-Araque E., Ortega Hernández-Agüero T.

Depto. Farmacología, Facultad de Farmacia, UCM

Searching for natural antioxidant products, anthocyanidins are polyphenolic compounds included in flavonoid group that previously showed antioxidant and neuroprotective effects in *in vitro* and *in vivo* models. These compounds can be found in several foods and medicinal plants as active substances.

The objective of this work is to evaluate the antioxidant effect of pelargonidin, malvidin and cyanidin at different concentrations (5, 25 y 100  $\mu$ M) over some oxidation's markers. The human astrocyte glioblastoma, cellular line U873, was used for a cellular injury model using Fenton's reagent ( $\text{FeSO}_4$  0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM) to measure glutathione levels (GSH) and to evaluate nitrite release induced by interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Moreover we have evaluated the possible protective effect of these compounds over cell viability (MTT) on 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) injury. MPTP is a neurotoxin precursor to MPP+, which causes permanent symptoms of Parkinson's disease.

Anthocyanidins could induce significantly GSH depletion induced by Fenton's reagent at different concentrations (CS, MS, MS2, PS and P100). Therefore, malvidin and pelargonidin seemed to have best results than cyanidin. In the presence of IFN- $\gamma$  all anthocyanidins induced significantly nitrite levels, noting that every compound at studied concentrations did not show significantly differences with untreated cells.

Moreover, anthocyanidins seemed to reduce partially the Parkinson's like effect induced by MPTP. All compounds, exhibited significantly higher cell viability than cells treated with MPTP alone.

These results suggest that anthocyanidins could contribute to antioxidant and neuroprotective effects of natural drugs and foods in which they are present.

#### 68 ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF MITRAPHYLLINE ON MACROPHAGE ACTIVATION: SIGNS TOWARD M2 PHENOTYPIC

Bermudez Palopán E.<sup>1</sup>, Montero de la Paz S.<sup>2</sup>, De la Puerta

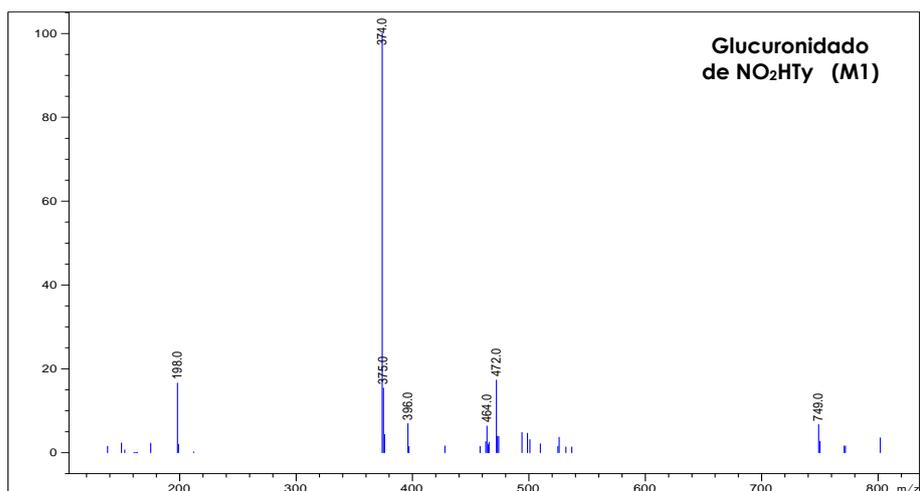
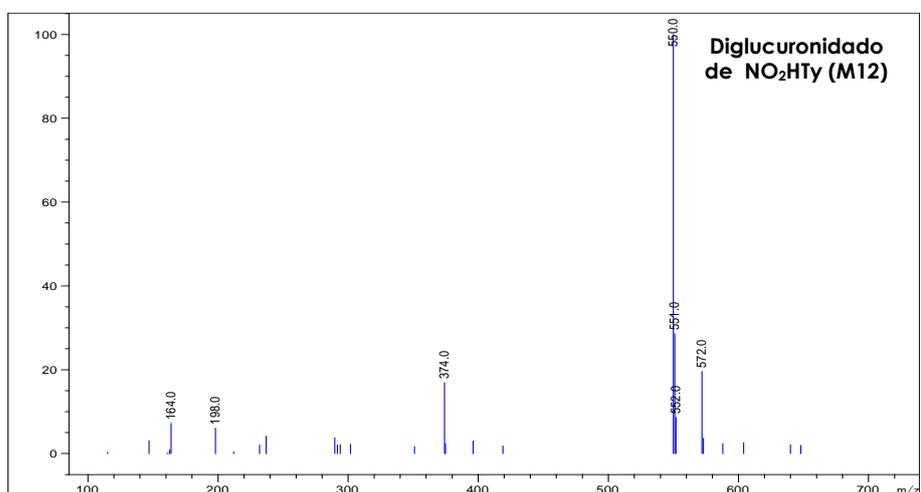
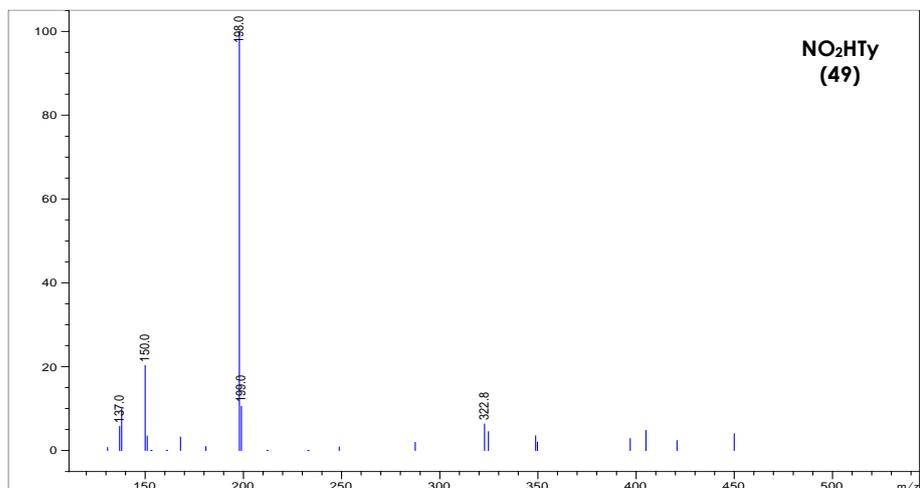
Higuera R.<sup>1</sup>, Fernández Arce A.<sup>1</sup>, Quiles Guerrero A.<sup>1</sup>, García Guerrero M.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, University of Seville, Seville; <sup>2</sup>Instituto de la Grasa, Superior Council of Spanish Research, Seville

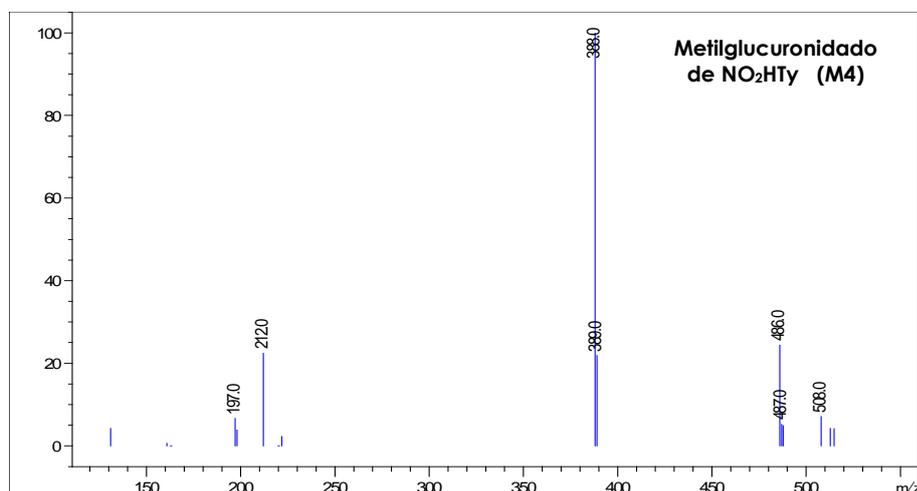
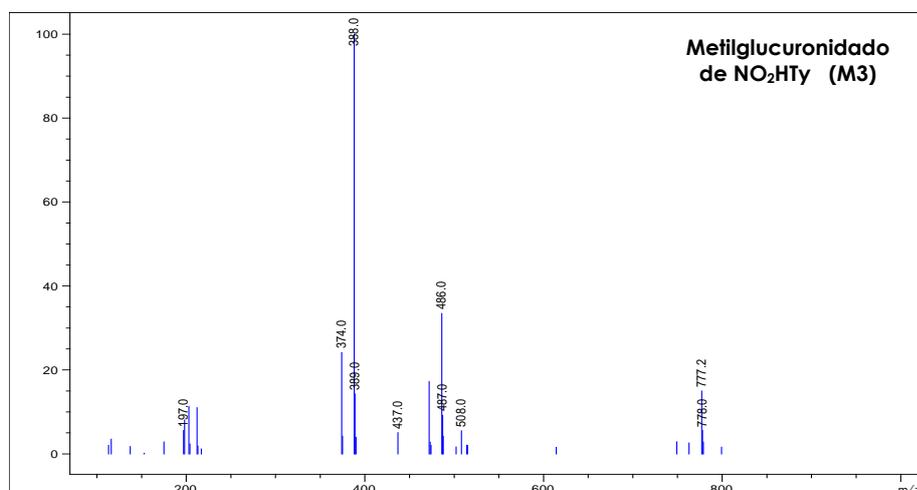
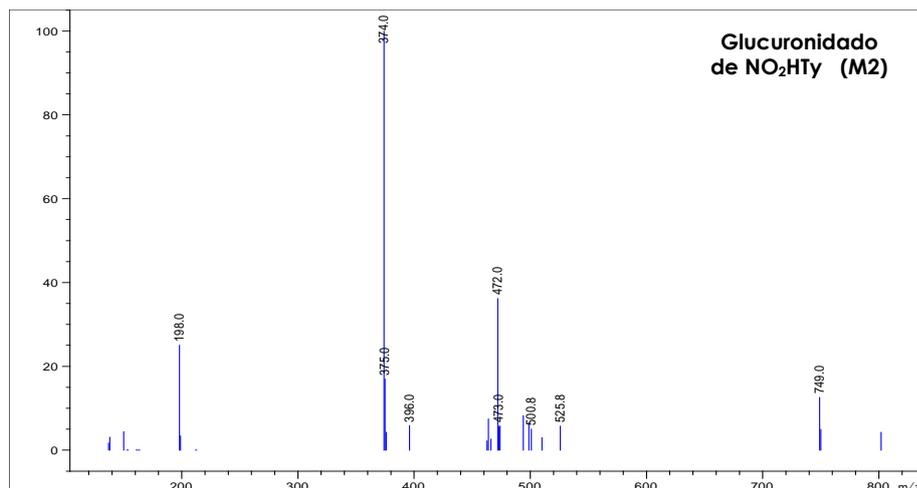
**Introduction:** Mitraphylline is the major pentacyclic oxindole alkaloid presented in *Celastrus Clavus*, widely used in the Peruvian Amazon to alleviate inflammation. Nowadays, there is no scientific data that prove this anti-inflammatory effect. One possible action is attributed to Mitraphylline by the inhibition of NF- $\kappa$ B pathway, which modulates several pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  is strongly involved on macrophages activation in inflammatory processes. M1 or classically activated macrophages have anti-microbial and cytotoxic properties, therefore M2 or alternative activated an anti-inflammatory and reparative macrophage. Macrophage polarization plasticity has important therapeutic implications.

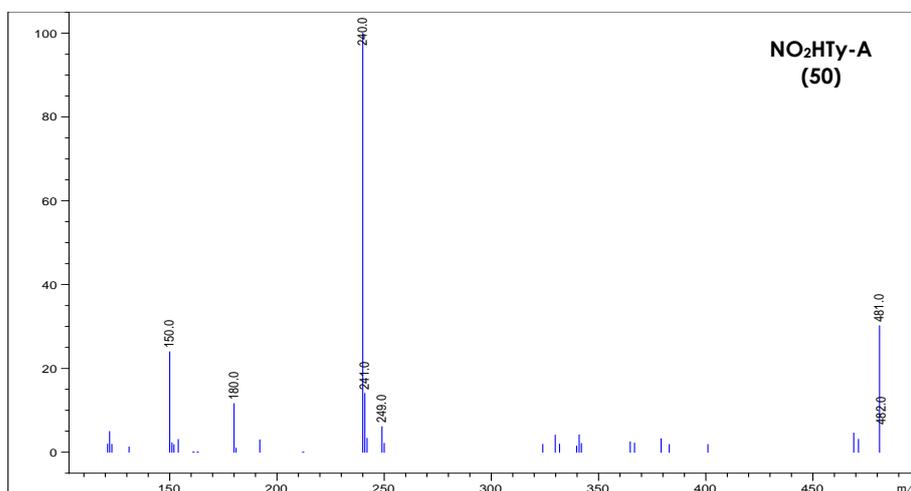
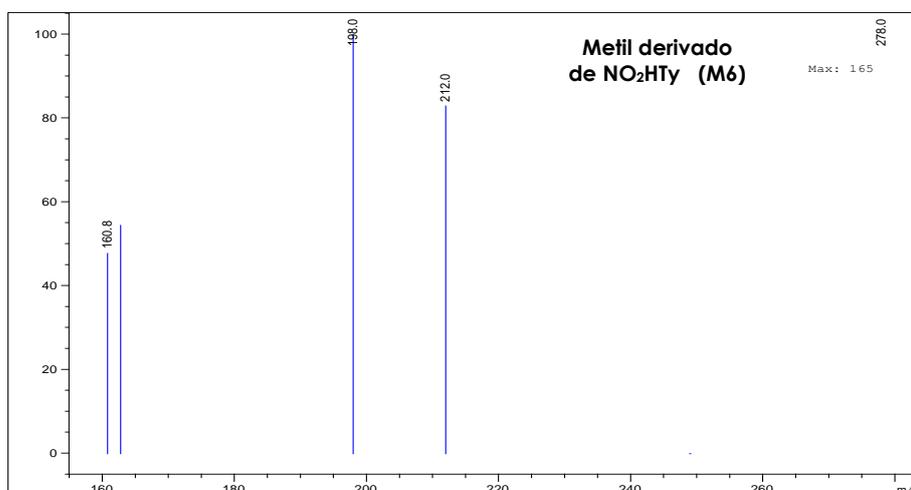
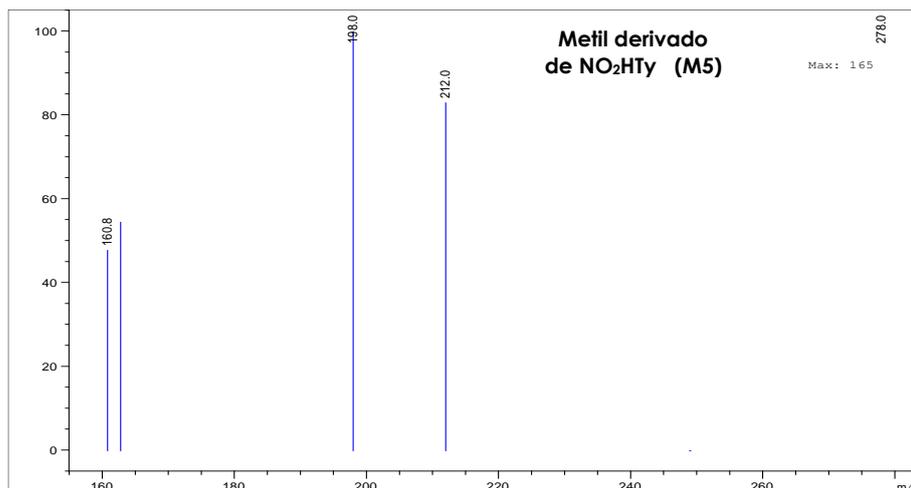
**Material/Methods:** The purpose of this study is to characterize the anti-inflammatory properties and the immunomodulatory effect of Mitraphylline, on M1/M2 polarization macrophage subset. *In vitro* studies with primary human monocyte-derived macrophages were performed at different doses of Mitraphylline and at different time points. We evaluated the mRNA expression of different pro-inflammatory cytokines, protein production and secretion of several markers involved on M1/M2 macrophage polarization.

## 9.4. Anexo 4. Espectros de masas

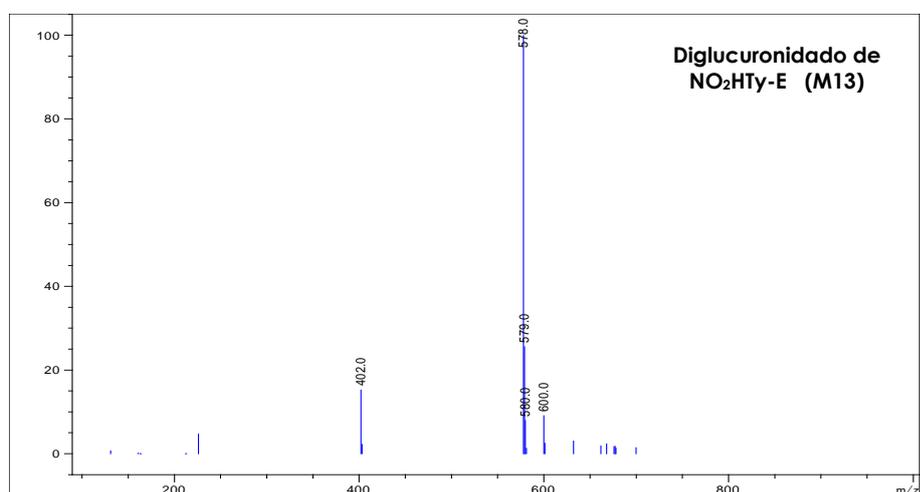
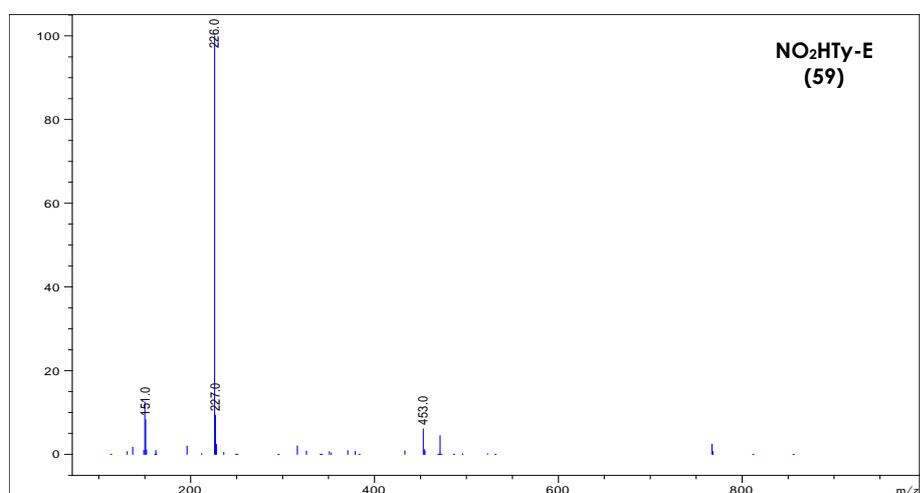
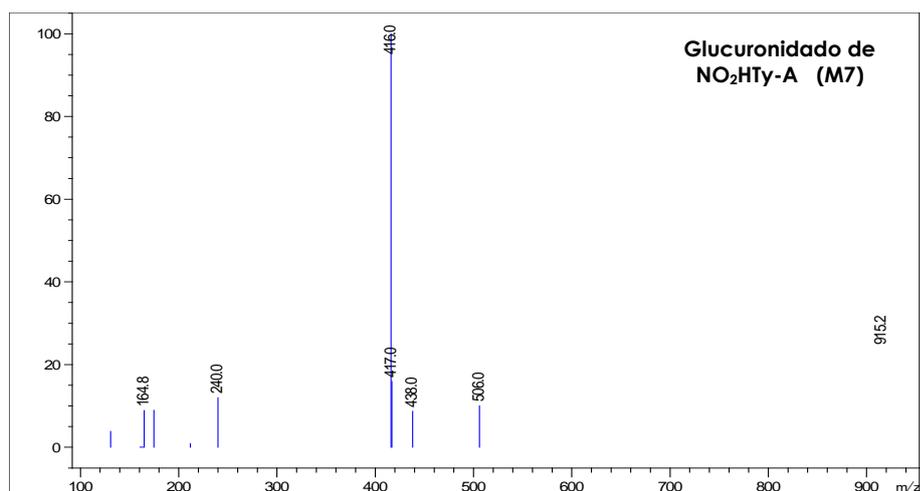


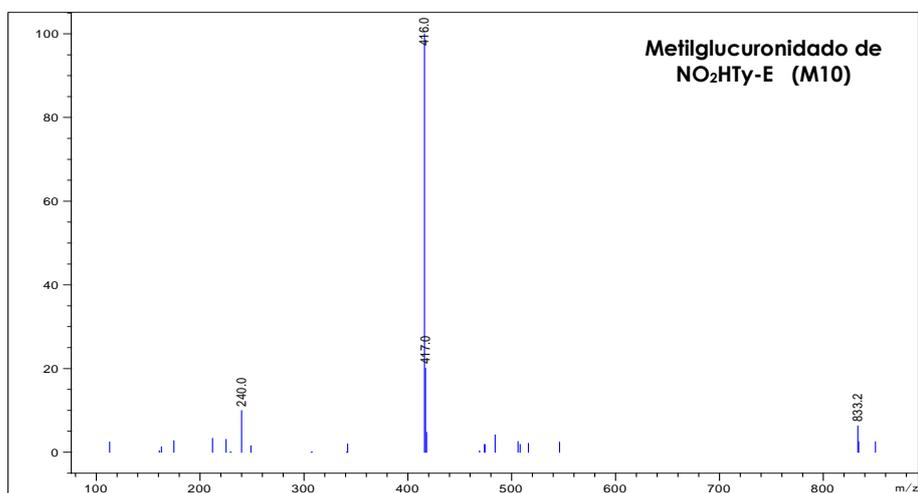
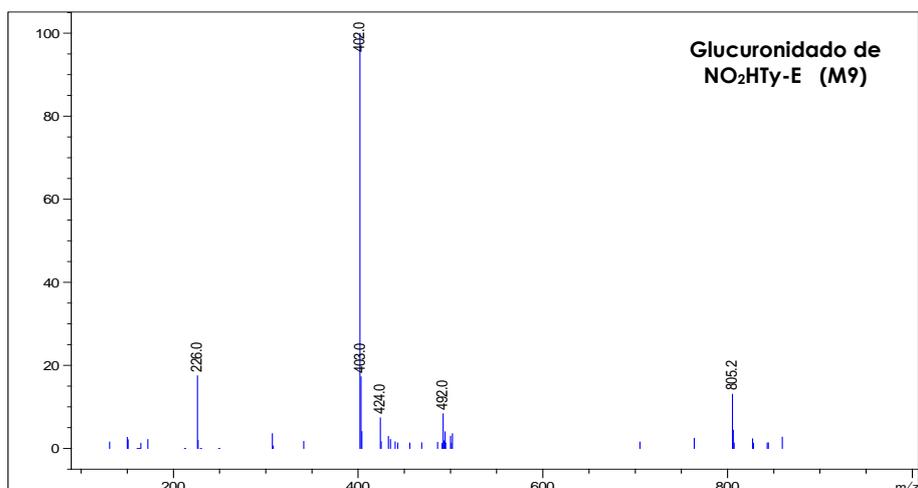
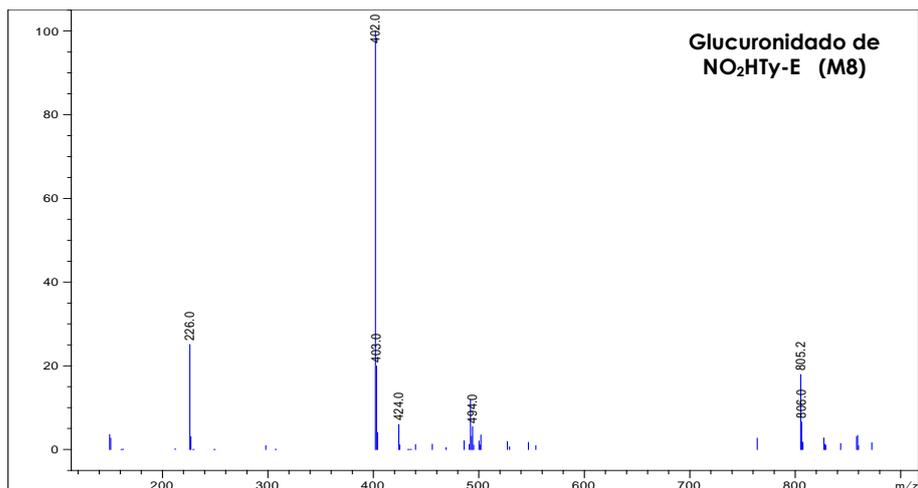
9. Anexo



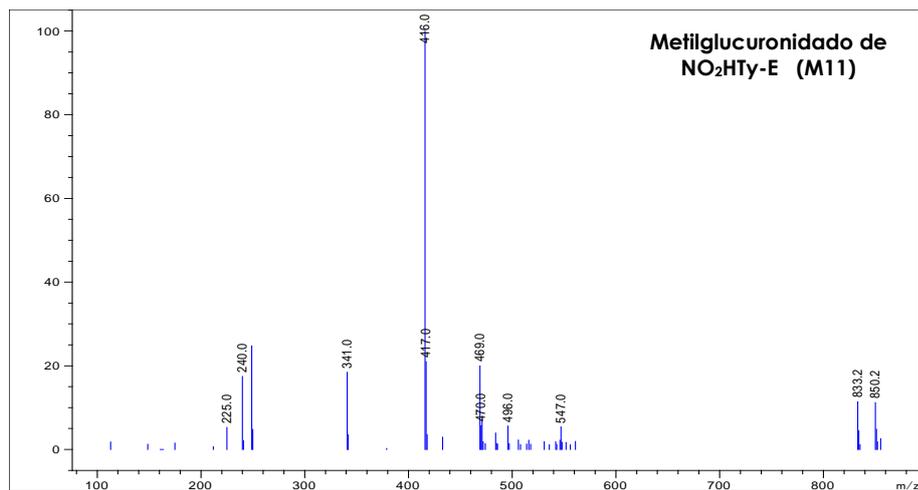


## 9. Anexo

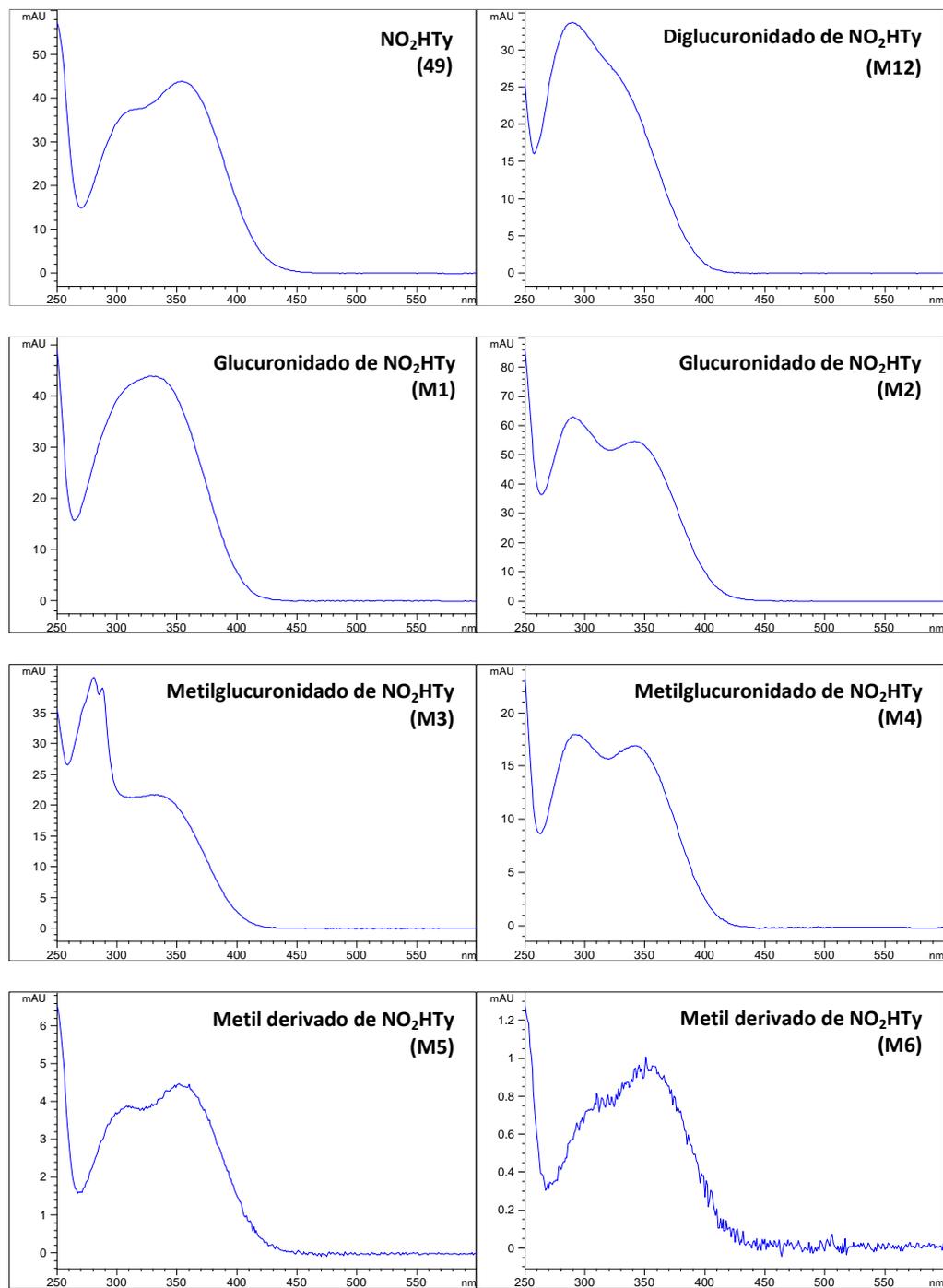




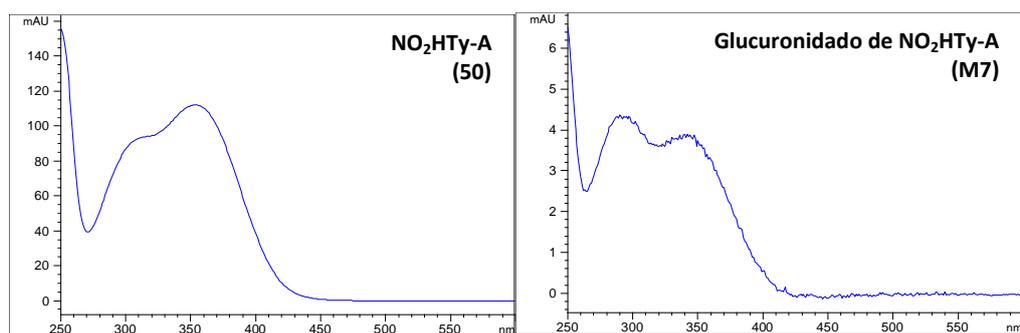
## 9. Anexo



## 9.5. Anexo 5. Espectros UV-vis

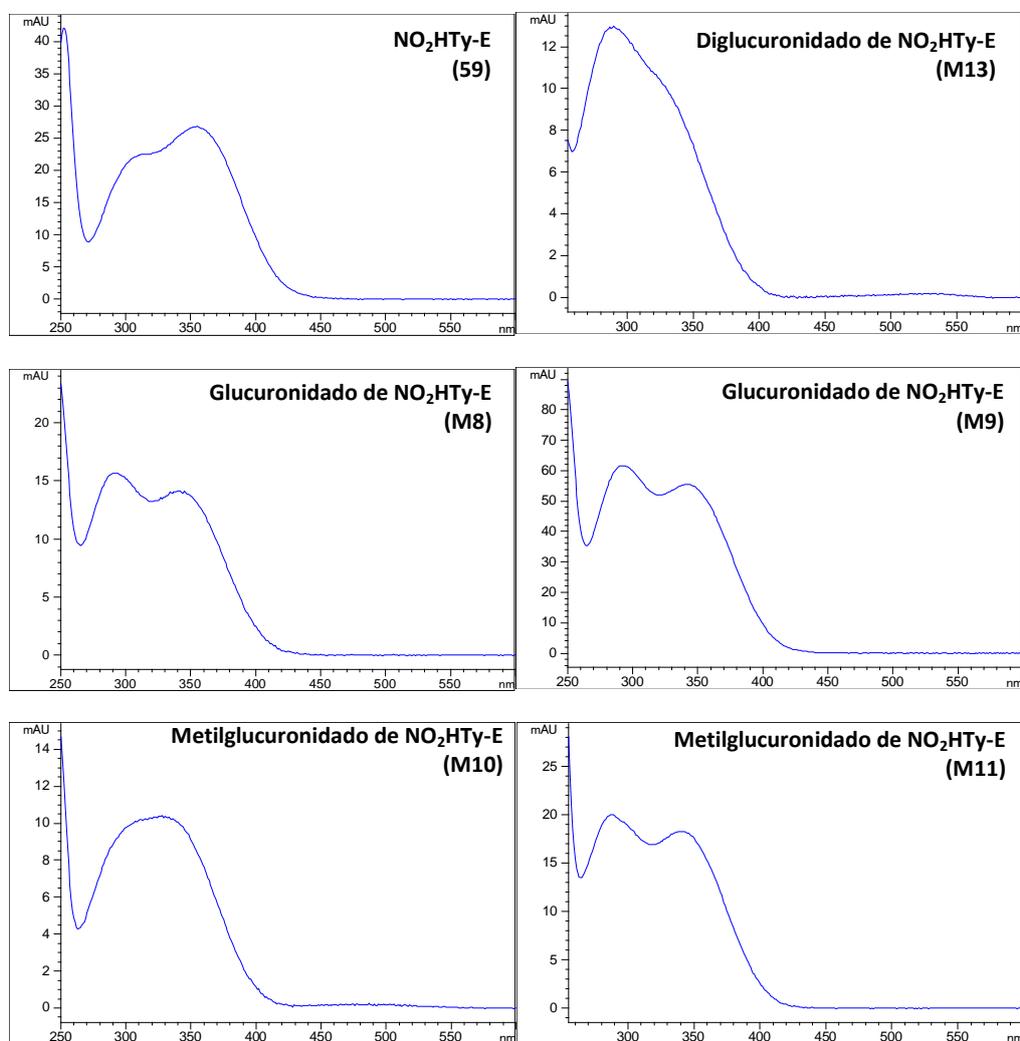


## 9. Anexo



**Figura 9.1**

Espectros UV-vis correspondiente a los compuestos NO<sub>2</sub>HTy (**49**) y NO<sub>2</sub>HTy-A (**50**) y sus metabolitos identificados tras incubación con células colónicas (Caco-2) y hepáticas (HepG2)



**Figura 9.2**

Espectros UV-vis correspondiente al compuesto NO<sub>2</sub>HTy-E (**59**) y sus metabolitos identificados tras incubación con células colónicas (Caco-2) y hepáticas (HepG2)