

UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DOCTORADO EN QUÍMICA



**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y POTENCIAL
CAPACIDAD CITOTÓXICA EN CÉLULAS LEUCÉMICAS DE
LA LÍNEA HL-60 DE NUEVOS COMPUESTOS DERIVADOS
DE ÁCIDO HIDROXICINÁMICO”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Química**

Por:

FRANCISCO ANTONIO MURA MARDONES

Director de Tesis

DR. CLAUDIO OLEA AZAR.

Co-Director de Tesis

DR. JAVIER MORALES VALENZUELA

**SANTIAGO- CHILE
2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

FRANCISCO MURA MARDONES

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Química, en el examen de defensa de Tesis rendida el día.....de de 2016.

Director de Tesis:

Dr. Claudio Olea Azar

Co-Director de Tesis:

Dr. Javier Morales Valenzuela

Comisión Informante:

Dra. María Cecilia Rojas (Presidenta)

Dra. Margarita Aliaga Miranda

Dra. Carolina Aliaga Vidal

Dr. Hernán Speisky Cosoy

Financiamiento

Esta tesis ha sido financiada por:

- Beca nacional CONICYT N° 21120376.
- Beca de financiamiento parcial de tesis Universidad de Chile.

Publicación

- **Mura, F.**, et al., *New insights into the antioxidant activity of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic systems: spectroscopic, electrochemistry, and cellular studies*. Free Radic Res, 2014. 48(12): p. 1473-84.

Participación en otras publicaciones

1. Morin Flavonoid Adsorbed on Mesoporous Silica, a Novel Antioxidant Nanomaterial. Francisco Arriagada, Olosmira Correa, Germán Günther, Santi Nonell, **Francisco Mura**, et al. (2016) Morin Flavonoid Adsorbed on Mesoporous Silica, a Novel Antioxidant Nanomaterial. PLOS ONE 11(11): e0164507. doi: 10.1371/journal.pone.0164507. Publicado: NOV 2016.
2. Study of Coumarin-Resveratrol Hybrids as Potent Antioxidant Compounds. Maria Joao Matos, **Francisco Mura**, Saleta Vasquez-Rodriguez, Fernanda Borges, Lourdes Santana, Eugenio Uriarte, Claudio Olea Azar. Molecules. 20(2), 3290-3308; doi:10.3390/molecules20023290. Publicado: FEB 2015.
3. Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. Consuelo Castro, **Francisco Mura**, Gabriela Valenzuela, Catalina Figueroa, Romina Salinas, M. Carolina Zuñiga, Josep Lluís Torres, Elisabet Fuguet, Carla Delporte. Food Research International. 64, 873-879. doi: 10.1016/j.foodres.2014.08.050. Publicado: OCT 2014.
4. Biological and chemical study of fused tri- and tetracyclic indazoles and analogues with important antiparasitic activity. Christian A. Díaz-Urrutia, Claudio A. Olea-Azar, Gerald Zapata, Michel Lapier, **Francisco Mura**, Benjamín Aguilera-Valenzuela, Vicente J. Arán, Rodrigo. López-Muñoz, Juan D. Maya. Spectrochimica Acta A. 95, 670-678. doi:10.1016/j.saa.2012.04.076. Publicado: SEPT 2012.

5. Indazoles and quinazolines as potential anti-Trypanosoma cruzi agents: An electrochemical, ESR and biological study. **Francisco Mura**, Hernán Speisky, Vicente Arán, Juan D. Maya, Claudio Olea-Azar, Benjamín Aguilera-Venegas. J. Spectrosc. Dyn, 3;8. Publicado: 2012.

Agradecimientos

Al finalizar esta etapa de vida me vienen a la memoria importantes momentos que han marcado una evolución emocional y profesionalmente.

Comienzo agradeciendo a mi familia por su apoyo y tolerancia en aquellos momentos en que me sentía agotado, dándome las herramientas para continuar y hacer lo que me gusta de la mejor manera posible. Por su constante cariño y preocupación, que me han impulsado a crecer como persona.

Al Dr. Claudio Olea que me recibió hace seis años en su laboratorio para desarrollar la memoria de pregrado y posteriormente la tesis de doctorado. No sólo ha sido un pilar fundamental en la generación de esta tesis a través de sus consejos y opiniones constructivas; también por aconsejarme en temas personales que me han permitido desenvolverme de manera más óptima en el ambiente laboral, así como también por apoyarme e interceder en las experiencias llevadas a cabo en el extranjero. Actos como estos se agradecen siempre y no se olvidan. Por las convivencias que hicieron más gratas las jornadas de trabajo en el laboratorio.

Al Dr. Javier Morales Valenzuela, quien me incorporó a su laboratorio, donde pude aprender herramientas más cercanas a la Farmacia y que fueron muy necesarias en este trabajo. Por todos los momentos buenos de convivencia extra-programática junto con los chicos del laboratorio de Farmacocinética que nunca se podrán olvidar.

A los Doctores de la Comisión, por sus aportes al darme nuevos enfoques en el tema desarrollado.

A la Dra. Fernanda Borges de la Universidad de Oporto, quien me abrió las puertas de su laboratorio y con quien pude retomar el gusto por la Síntesis Orgánica.

También por su apoyo y preocupación en mi formación de doctor. A Tiago Silva, por sus discusiones en torno a los ácidos cinámicos.

A la Dra. María Carolina Zúñiga, por sus consejos en el ámbito profesional y personal. Por su ayuda constante y desinterés en compartir sus conocimientos.

A las académicas del departamento de Tecnología Farmacéutica, Profesoras Edda y Olosmira, con quienes siempre tuve alguna conversación de pasillo y entregando buenas vibras para que todo saliese bien. También quisiera agradecer a la Dra. Karina Valdés que me recibió con los brazos abiertos desde el comienzo en su laboratorio y siempre tuvo la simpatía para impulsarme a hacer bien las cosas.

A los chicos del laboratorio de Farmacocinética: Francisco, Guillermo, Vanessa y Lennin. Personas con las que pude discutir temas científicos y compartir dentro y fuera de la Facultad.

A los chicos del laboratorio de Radicales Libres y Antioxidantes: Roberto, Jeannette, Melissa, Benjamín, Christian y a Germán; grandes amigos que conocí en el laboratorio. A Michel, por ser una de las personas más desinteresadas que he conocido, de inteligencia sobresaliente y constante apoyo. A la nueva camada, Jorge, Gabriela, Estefanía, Manuel y a Mauricio, por los buenos momentos que pasamos y las onces de laboratorio.

A Alejandra Herrera, quien fue mi eterna compañera tanto en los cursos, en los laboratorios y en los eventos fuera de la Universidad. Por aquellas conversaciones y momentos absurdos. Por escucharme y aconsejarme cuando estaba depresivo. Por abrirme las puertas de su casa y presentarme a su familia quienes me recibieron y acogieron desde el primer momento.

Resumen

Los ácidos hidroxicinámicos (ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, entre otros) son compuestos fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en alimentos de origen vegetal. Su estructura química le permite apagar radicales libres, actuando como antioxidantes, propiedad que condiciona su actividad oncoprotectora y anticancerígena. Sin embargo, dependiendo de su concentración y otros factores, también poseen actividad pro-oxidante.

De esta forma, en el presente trabajo se estudiaron trece compuestos derivados de ácido hidroxicinámico sintetizados en la Universidad de Oporto (Portugal), de los cuales dos corresponden a derivados de ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico), ocho derivados de ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico) y un derivado trihidroxilado (ácido 3,4,5-trihidroxicinámico); siendo evaluados en cuanto a su actividad antioxidante en medio homogéneo, en modelo de membranas lipídicas y células. Además se determinó su actividad pro-oxidante en presencia de hierro y se relacionó con su actividad tóxica en células leucémicas humanas de la línea HL-60.

Los compuestos estudiados fueron electroactivos a la oxidación, donde se evidenció menores potenciales de oxidación para el compuesto AC3 (ácido 3,4,5-trihidroxicinámico) (0,10 V) y para los derivados catecolicos (AC1 y AC5) (0,20-0,28 V) en comparación con los derivados de ácido ferúlico (~ 0,38-0,46 V). La generación de intermediarios radicalarios durante la oxidación de estos compuestos fue comprobada a través de Resonancia paramagnética electrónica (EPR).

Todos los derivados presentaron mayor capacidad antioxidante frente a los radicales peroxilos ($\text{ROO}\cdot$) y alcoxilos ($\text{RO}\cdot$) generados a partir de la termólisis de AAPH, en comparación al compuesto estándar Trolox. AC1 y AC5, que contienen un anillo catecol, exhibieron la mayor actividad antioxidante (índice ORAC-FL ~ 4,0). Sin embargo, aquellos derivados 3,4-dihidroxilados y con un grupo con propiedades electro-atractoras y con capacidad aceptora de puente de hidrógeno (-OH para AC3

y $-\text{NO}_2$ para AC13) presentaron la menor actividad antioxidante de la serie estudiada (índice ORAC-FL $\sim 1,0$). Estos resultados son concordantes con los índices ORAC-EPR, donde AC1 y AC5 fueron los menos reactivos frente al radical alcoxilo y con mayor capacidad ORAC-FL mostrando tiempo de inducción prolongados; mientras que AC3 y AC13 fueron los más reactivos frente a los radicales alcoxilos y presentaron los menores índices ORAC-FL, sin generar tiempos de inducción, indicando que se consumen rápidamente al reaccionar con los radicales alcoxilos.

Los ensayos de citotoxicidad indican que los compuestos estudiados son poco tóxicos en un rango de concentraciones de 10 y 100 μM , en las células de epitelio vascular humano EA.hy 926; y exhibieron baja toxicidad en células leucémicas humanas HL-60 en un rango de concentraciones de 10 y 100 μM . Sin embargo, el compuesto AC3 disminuyó la viabilidad de las células HL-60 en aprox. 34 % con respecto al control, cuando es incubada a 100 μM por 24 horas.

A partir de los ensayos biológicos de toxicidad se escogieron cuatro compuestos de acuerdo a su selectividad por las células leucémicas en comparación con las células vasculares. Todos los compuestos disminuyeron la generación o apagaron los radicales libres de la termólisis de AAPH y de menadiona en las células EA.hy 926.

En cuanto a la reactividad de estos compuestos con el radical hidroxilo, el derivado trihidroxilado (AC3) presenta las mayores velocidades de apagamiento del radical hidroxilo, ya sea generado por fotólisis como por la reacción de Fenton en presencia de peróxido de hidrógeno, comportamiento equivalente fue observado en el compuesto AC13. Los derivados AC1 y AC5 presentaron altas velocidades de apagamiento del radical hidroxilo, sin embargo, la tendencia varió de acuerdo a la presencia o ausencia de hierro (II). En el mecanismo mediado por Fe(II) se evidenció la aceleración del proceso de apagamiento del radical hidroxilo debido a la capacidad quelante de los grupos catecoles. Además, los compuestos AC1 y AC5 actúan como reductores del hierro (III), cuando este ion se encuentra en

concentraciones superiores con respecto al ácido hidroxicinámico, presentando un comportamiento pro-oxidante en el sistema.

Al evaluar el efecto de los ácidos hidroxicinámicos en la formación/apagamiento de radicales libres en las células HL-60 se evidenció que todos los compuestos ensayados actuaban como antioxidantes a 100 μM , mientras que AC1, AC3 y AC5 eran pro-oxidantes a concentraciones de 1 y 10 μM . Indicando que el efecto tóxico de AC3 en esta línea celular no transcurriría mediante un mecanismo pro-oxidante de reciclaje redox en presencia de la cupla Fe(II)/Fe(III) .

Summary

Hydroxycinnamic acids (p-coumaric, caffeic, ferulic and synapic acids, among others) are phenolic compounds that are widely distributed in foods of plant origin. Its chemical structure allows them to scavenge free radicals, acting as antioxidants, a property that conditions its oncoprotective and anticancer activity. However, depending on their concentration and other factors, they also could behave as pro-oxidants.

According to this, in the present project, thirteen hydroxycinnamic acid derivative compounds which were synthesized at the University of Porto (Portugal) were studied, two of which are derivatives of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid), eight derived from ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid) and a trihydroxy derivative (3,4,5-trihydroxycinnamic acid); their antioxidant activity in homogeneous medium, lipid membranes and cells was evaluated. Besides its pro-oxidant activity in the presence of iron and related to its toxic activity in HL-60 human leukemic cell line was determined.

The compounds studied were oxidized in the experimental conditions, where the compound AC3 (3,4,5-trihydroxy acid) had the lowest oxidation potential (0.10 V). Catechol derivatives (AC1 and AC5) had also low oxidation potentials (0.20-0.28 V) in comparison to ferulic acid derivatives (~0.38-0.46 V). Generation of radical intermediates during the oxidation of these compounds was verified by electron paramagnetic resonance (EPR).

All derivatives showed a higher antioxidant capacity compared to peroxy radicals (ROO •) and alkoxy (RO •) generated from thermolysis of AAPH, compared to the standard compound Trolox. AC1 and AC5, containing a catechol ring, exhibited the highest antioxidant activity (ORAC-FL index ~ 4.0). However, the

derivatives that have a 3,4-dihydroxy and a group with electro-withdrawing properties and hydrogen bond accepting capacity (-OH for AC3 and -NO₂ for AC13) had the lowest antioxidant activity of the series studied (ORAC -FL ~ 1.0). These results are consistent with the ORAC-EPR indices where AC1 and AC5 were the least reactive against alkoxy radicals and more active in ORAC-FL showing prolonged induction time; while AC3 and AC13 were the most reactive towards alkoxy radicals and had the lowest ORAC-FL indices, without generating induction times, indicating that they were rapidly consumed by alkoxy radicals.

Cytotoxicity assays show that the compounds studied are slightly toxic at concentration range from 10 to 100 µM in EA.hy 926 human vascular epithelium cells; and exhibited low toxicity in HL-60 human leukemic cells at a concentration range of 10 and 100 µM. However, the compound AC3 decreased the viability of HL-60 cells in approx. 34% relative to control when incubated at 100 µM for 24 hours.

From the toxicity bioassays four compounds according to their selectivity towards leukemic cells compared to vascular cells were chosen. All compounds decreased or extinguished generation of free radicals during the thermolysis of AAPH and the metabolism of menadione in EA.hy 926 cells.

Regarding to the reactivity of these compounds against hydroxyl radical, the trihydroxy derivative (AC3) has higher reactivity against the hydroxyl radical, either generated by photolysis or by the Fenton reaction in the presence of hydrogen peroxide, similar behavior was observed in AC13. AC1 and AC5 also showed high hydroxyl radical scavenging properties; however, the trend varied according to the presence or absence of iron (II). In the Fe (II) mediated-mechanism, the scavenging of hydroxyl radicals was higher due to the chelating ability of the catechol groups. Furthermore, AC1 and AC5 compounds act as reductors of iron (III), when this ion is at higher concentrations with respect to the hydroxycinnamic acid, presenting a pro-oxidant behavior in the system.

Evaluating the effect of hydroxycinnamic acids in the generation /quenching of free radicals in HL-60 cells, it showed that all the tested compounds acted as

antioxidants at 100 μM ; while AC1, AC3 and AC5 were pro-oxidants at concentrations of 1 and 10 μM . This indicates that the toxic effect observed in AC3 in this cell line would not be explained by a pro-oxidant mechanism through an iron recycling-redox via.

Tabla de contenido

RESUMEN	9
SUMMARY	12
TABLA DE CONTENIDO	15
LISTADO DE ACRÓNIMOS.....	18
ÍNDICE DE FIGURAS.	19
ÍNDICE DE TABLAS.....	23
1. INTRODUCCIÓN.....	24
Propósito.....	38
2. HIPÓTESIS.....	40
3. OBJETIVOS GENERALES.....	40
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
5. METODOLOGÍAS.....	42
5.1 Voltamperometría cíclica y de pulso diferencial.....	42
5.2 Caracterización de especies radicalarias generadas por oxidación electroquímica	54
5.3 ORAC-FL.....	55
5.4 Ensayo ORAC-EPR.....	59

5.5 Ensayo de citotoxicidad en células EA.hy 926 y HL-60, mediante la metodología de reducción del MTT.....	61
5.6 Coeficiente de reparto y de distribución y pKa.....	63
5.7 Reactividad frente al radical hidroxilo generado mediante la reacción de Fenton en medio homogéneo.....	65
Ensayos en medio microheterogéneo.....	66
5.8 Preparación de liposomas y vesículas.....	66
5.9 Reparto en medio homogéneo y vesículas de DODAC y liposomas de DPPC.....	68
5.10 Reactividad frente al radical hidroxilo en medio homogéneo y en liposomas de DODAC, DPPC, DPPC/POPC y membranas de eritrocitos.....	71
5.11 Anisotropía de fluorescencia.....	73
5.12 Actividad antioxidante intracelular empleando menadiona mediante la metodología de <i>spin-trapping</i>	75
5.13 Actividad antioxidante intracelular empleando la diacetato de diclorodihidrofluoresceína.....	76
5.14. Determinación de la estequiometría y constante de equilibrio de complejación por el método de las variaciones continuas.....	79
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
6.1. Estudio electroquímico.....	82
6.2 Caracterización mediante EPR de los radicales derivados de AHC generados electroquímicamente.....	94
6.2.1 Generación en medio aprótico polar (DMSO).....	94
6.2.2. Generación en medio acuoso.....	99
6.3 ORAC-FL.....	99
6.4 Ensayo ORAC-EPR.....	105
6.5 Ensayo de citotoxicidad en células de endotelio vascular humano (línea EA.hy 926) y células leucémicas humanas (línea HL-60), mediante la metodología de reducción del MTT.....	109
6.6 Reparto en vesículas unilamelares de DODAC y liposomas de DPPC.....	112

6.7 Anisotropía de Fluorescencia en estado estacionario en liposomas de DPPC/POPC y fantasmas de eritrocitos.	115
6.6 Reactividad frente al radical hidroxilo generado por fotólisis en vesículas de DODAC, liposomas de DPPC, DPPC/POPC y membranas de eritrocitos.	118
6.7 Actividad antioxidante intracelular empleando menadiona mediante la metodología de <i>spin-trapping</i>	122
6.8 Actividad antioxidante celular (AAC).	123
6.9 Reactividad frente al radical hidroxilo generado mediante la reacción de Fenton.	125
6.10 Estudio de la actividad pro-oxidante de los AHC en células HL-60 mediante <i>spin-trapping</i>	133
7 CONCLUSIONES.	135
8 ANEXOS.	138
Anexo 1. Caracterización fisicoquímica de los AHC: espectroscopía UV-vis, parámetros de cromatografía HPLC-DAD, lipofilia y pKa.	138
Caracterización mediante espectrofotometría UV-visible.	138
Lipofilia y pKa.	143
Anexo 2. Capacidad reductora de los AHC frente hierro (III) en medio ácido. ...	147
Anexo 3. Mediciones de tamaño promedio y potencial zeta.	148
9 REFERENCIAS.	149

Listado de acrónimos.

- AAC: actividad antioxidante celular.
- AHC: derivados de ácidos hidroxicinámicos.
- AAPH: hidrocloreuro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano).
- MTT: bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).
- NADPH: nicotín adenin dinucleótido fosfato.
- ORAC-FL: capacidad de absorción de especies reactivas de oxígeno empleando fluoresceína (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*).
- PBN: N-terbutil- α -fenilnitrona
- POBN: α -(4-piridil-1-óxido)-N-terbutilnitrona.
- PUFA: ácido graso poliinsaturado (*Poly Unsaturated Fatty Acid*).
- ROS: especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*).
- TBAP: perclorato de tetrabutilamonio.
- VC: voltamperometría cíclica.
- VPD: voltamperometría de pulso diferencial.

Índice de figuras.

Figura 1 Esqueleto del ácido cinámico.....	25
Figura 2 Principales derivados de ácido cinámico presentes en la dieta	26
Figura 3 Esquema de las reacciones de lipoperoxidación de PAPC .	33
Figura 4 Transporte celular del hierro en la célula eucarionte	37
Figura 5 Gráfico de la tendencia de la función de corriente ($I_p v^{-1/2}$) y la razón de corriente (I_{pa}/I_{pc}) con las variaciones de velocidad de barrido de potencial (v)	52
Figura 6 Estructuras químicas de Trolox y AAPH (o ABAP).	56
Figura 7 Mecanismo de oxidación de la sonda fluoresceína.....	58
Figura 8 Mecanismo de generación de los radicales alcoxilos provenientes de la fotólisis de AAPH en medio acuoso aeróbico.....	60
Figura 9 Reducción enzimática de la sal de (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (MTT).	62
Figura 10 Estructuras de DODAC, DPPC y POPC.....	67
Figura 11 Localización de las sondas fluorescentes ANS, TMA-DPH y DPH en una bicapa lipídica.	75
Figura 12 Mecanismo de reciclaje redox de menadiona en la célula eucarionte.....	76

Figura 13 Representación esquemática del ensayo de actividad antioxidante celular empleando la sonda DCFH ₂	78
Figura 14 Secuencia de internalización de la sonda DCFH ₂ -DA y posterior oxidación intracelular.	79
Figura 15 Voltamperogramas cíclicos y de pulso diferencial de AC1. Gráfico del logaritmo de la corriente de pico anódico versus el logaritmo de la velocidad de barrido en VC. Gráfico de la función de corriente ($I_{pa}/v^{1/2}$) versus la velocidad de barrido en VC.	84
Figura 16 Gráfico razón de corrientes I_{pa}/I_{pc} versus la velocidad de barrido en V/s para el compuesto AC1. Variación del potencial de pico anódico E_{pa} con el logaritmo de la velocidad de barrido.....	85
Figura 17 Reacción de oxidación del ácido caféico en medio prótico	86
Figura 18 Voltamperograma cíclico y de pulso diferencial del ácido ferúlico (AC2)	87
Figura 19 Voltamogramas de pulso diferencial del ácido ferúlico (AC2) empleando un electrodo de trabajo de carbón vítreo y un electrodo de plata	88
Figura 20 Mecanismos de oxidación de ácido ferúlico	89
Figura 21 Voltamperograma cíclico y de pulso diferencial de AC3.....	90
Figura 22 Reacción de oxidación de AC3.....	90
Figura 23 Relación entre pKa y el potencial de oxidación.....	93
Figura 24 Espectro EPR de AC1-Zn ²⁺ ; AC3-Zn ²⁺ ; AC5-Zn ²⁺ ; AC13-Zn ²⁺	96
Figura 25 Aducto radicalario entre el ácido ferúlico y PBN en DMSO	98
Figura 26 Posible mecanismo del aducto radicalario formado entre los derivados de ácido ferúlico y el atrapador de spin PBN en DMSO.	98

Figura 27 Perfil de decaimiento de la fluorescencia del compuesto AC1 y AC3.....	100
Figura 28 Gráfico de la relación entre la concentración de AC1 y el área bajo la curva neta (AUC-AUC ₀) AHC.	100
Figura 29 Gráfico de los índices ORAC-FL frente a la reactividad normalizada.....	105
Figura 30 Decaimiento de la intensidad de la señal correspondiente al aducto DMPO-OR a distintas concentraciones de AHC	106
Figura 31 Gráfico de la razón de intensidades del aducto DMPO-OR en ausencia de AHC (I ₀) y en presencia de de AHC (I) al aumentar la concentración de AHC.....	107
Figura 32 Porcentaje de viabilidad en células EA.hy 926 de los derivados de AHC.....	110
Figura 33 Porcentaje de viabilidad en células leucémicas de HL-60 de los derivados de AHC.....	110
Figura 34 Espectro de la primera derivada (dA/dλ) en un barrido de longitudes de onda de AC2. Gráfico de [L]/ΔD versus [L] del compuesto AC2.	112
Figura 35 Valores de logP, logK _p (DODAC) y logK _P (DPPC) de los derivados de AHC.....	113
Figura 36 Gráficos de anisotropía de fluorescencia (r) de los derivados de AHC en liposomas de DPPC empleando las sondasDPH, TMA-DPH y ANS	116
Figura 37 Diagrama de la posible interacción entre los derivados de ácido hidroxicinámico y las bicapas lipídicas de fosfolípidos.....	117
Figura 38 Histograma de la intensidad de la señal aducto radicalario DMPO-OH en presencia de derivados de AHC.....	122

Figura 39 Diagrama de la interacción de los derivados de AHC en un sistema Fenton en presencia de DMPO.....	126
Figura 40 Histograma de la intensidad del aducto DMPO-OH• en presencia de los derivados de AHC	127
Figura 41 Histograma de la intensidad de la señal del aducto radicalario DMPO-OH a concentraciones crecientes de Fe(II).....	129
Figura 42 Gráfico de la absorbancia del complejo AC1/Fe(III) a distintas fracciones molares del metal.....	130
Figura 43 Representación de la estructura del complejo $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{AC1})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$	130
Figura 44 Espectros de la formación del espín-aducto DMPO-OH•.	132
Figura 45 Diagrama de los posibles aductos radicalarios generados a partir del radical hidroxilo, del radical α -metilo (a partir del metanol que es co-solvente) y de los radicales del AHC.....	133
Figura 46 Histograma de la intensidad de la señal del espectro correspondiente a la formación del aducto DMPO-OH• en HL-60.....	134
Figura 47 Espectro UV de AC1 a distintas concentraciones. Curva de calibrado de AC1.	140
Figura 48 Gráfico entre el logaritmo del coeficiente de reparto n-octanol/agua (logP) y el logaritmo del coeficiente de retención (logk') para todos los compuestos.	146
Figura 49 Histograma del poder reductor de cada compuesto derivado de AHC. Gráfico del poder reductor normalizado con respecto a la solución control de los compuestos AC1 y AC3.	148

Índice de tablas

Tabla I. Estructuras de los compuestos estudiados derivados de ácido 4-hidroxicinámico.....	39
Tabla II. Resumen con los principales criterios de diagnóstico para los diferentes mecanismos de oxidación en VC.....	47
Tabla III. Principales mecanismos electródicos y algunos criterios de diagnóstico. .	48
Tabla IV. Potenciales de oxidación de los AHC	91
Tabla V. Constantes de acoplamiento hiperfino experimentales de AHC.....	97
Tabla VI. Valores de índice ORAC-FL de AHC	101
Tabla VII. Comparación de los índices ORAC-EPR y ORAC-FL de los AHC...	107
Tabla VIII. Viabilidad en EA.hy926 y HL-60. Índices de selectividad	111
Tabla IX. $\log K_P$ (DODAC) y $\log K_P$ (DPPC) de los AHC.	114
Tabla X. Constantes de velocidad experimental (s^{-1}) de los AHC en vesículas de DODAC, liposomas de DPPC, DPPC/POPC y fantasmas de eritrocitos.	120
Tabla XI. Razón de constantes experimentales entre los AHC en estudio en los diversos medios de reacción.....	121
Tabla XII. Valores de %AAC en células EA.hy926 de los AHC.	124
Tabla XIII. Coeficientes de extinción molar en agua, tampón fosfato 0,1 m pH 7,4 y metanol de los AHC.....	141
Tabla XIV. Tiempo de retención, logaritmo de la constante de retención ($\log k'$), $\log P$, $\log D$ y pK_a , de los AHC.....	145

1. Introducción.

El daño oxidativo provocado en moléculas de relevancia biológica, como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, se ha vinculado con numerosos eventos fisiológicos como el proceso de envejecimiento y con diversas patologías y desórdenes, tales como la enfermedad de Parkinson y Alzheimer, e inclusive el cáncer [1-3]. El daño acumulativo provocado por especies oxidantes y su implicancia en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo depende, entre otros factores, del tipo de tejido u órgano donde el proceso oxidativo tiene lugar. En general, las especies radicalarias son químicamente inestables y poseen una alta reactividad. Aunque se forman bajo condiciones fisiológicas, su nivel es mantenido relativamente bajo debido a la existencia de un eficiente sistema de defensa antioxidante. Sin embargo, bajo ciertas condiciones patológicas, la sobreproducción puede exceder la habilidad de los antioxidantes endógenos en su función detoxificadora [4]. El consumo de antioxidantes exógenos, tales como compuestos polifenólicos de origen vegetal, puede representar una aproximación efectiva para disminuir el daño oxidativo. Los antioxidantes son sustancias presentes en concentraciones menores comparadas con las del sustrato oxidable, los cuales retrasan o previenen notoriamente la oxidación del sustrato biológico [5]. Algunos factores que gobiernan la capacidad antioxidante de un compuesto son: i) la reactividad química inherente contra los radicales libres, ii) la estabilidad del radical libre generado a partir del antioxidante, iii) la estabilidad térmica, iv) la concentración efectiva y difusión de la especie antioxidante; y v) el sinergismo entre antioxidantes [6]. Los antioxidantes pueden actuar mediante diversos mecanismos antioxidantes tales como la quelación de metales con actividad redox, el *scavenging* de radicales libres y la inhibición de sistemas enzimáticos pro-oxidantes [6-8]. La actividad antioxidante de los polifenoles de la dieta ha sido epidemiológicamente vinculada con la reducción de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo en poblaciones que consumen altos niveles de frutas y vegetales [9]. En particular, la

habilidad de polifenoles, y/o sus metabolitos para apagar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente), se ha asociado directamente con los beneficios de consumir dietas ricas en frutas y vegetales [10].

Los ácidos cinámicos o derivados del ácido 3-fenil-2-propenoico son metabolitos secundarios que se encuentran ampliamente distribuidos en plantas y granos [11]. Su estructura base está conformada por un anillo bencénico unido a una cadena de ácido acrílico (**Figura 1**).

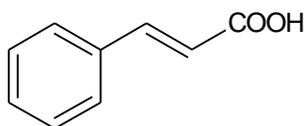


Figura 1 Esqueleto del ácido cinámico.

Los principales hidroxicinamatos encontrados en la dieta son los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, generalmente presentes en la forma de glicósidos o éster de ácido quínico [12]. La esterificación de los ácidos trans-cinámicos con ácido quínico da lugar a una familia de compuestos llamados ácidos clorogénicos (**Figura 2**), subgrupo en los cuales se incluyen los ácidos cafeoilquínico, feruloilquínico, p-cumaroilquínico y di-cafeoilquínico, dependiendo del tipo de ácido cinámico presente.

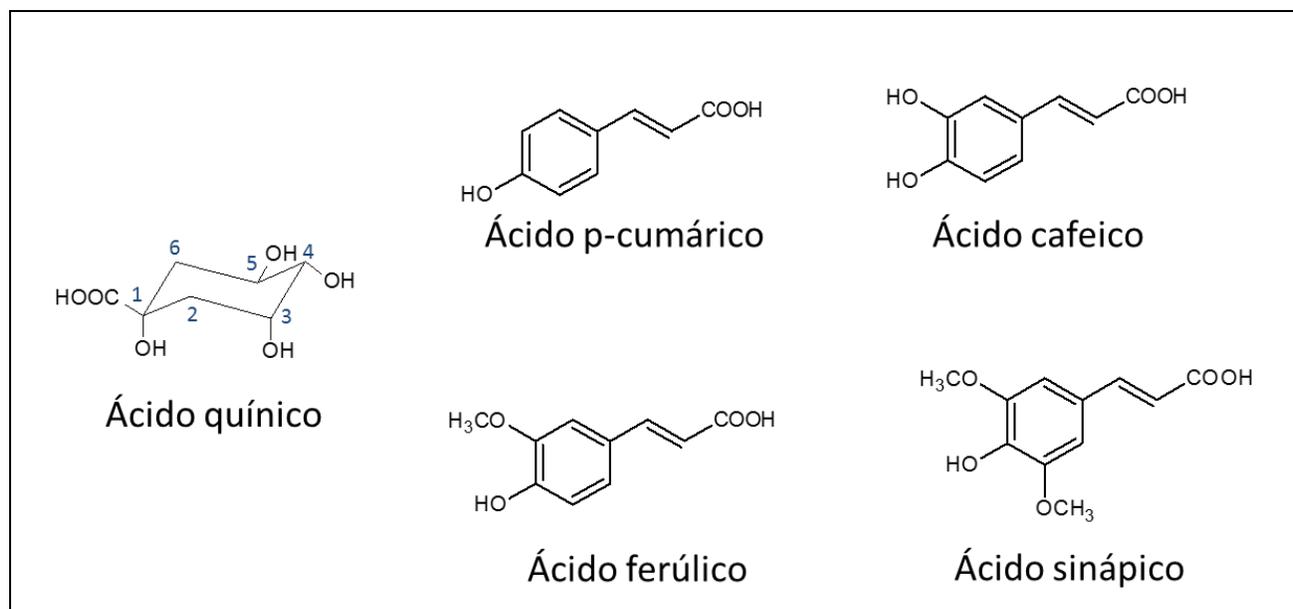


Figura 2 Principales derivados de ácido cinámico presentes en la dieta. Conjugados con ácido quínico forman la subfamilia de ácidos clorogénicos.

Los tomates contienen las formas O-glicosiladas de los ácidos cafeico, ferúlico y p-cumárico en el rango de 11-37 mg/Kg en peso fresco, mientras que la espinaca contiene cinamoilglucosa en el rango de 16-64 mg/Kg, la lechuga contiene ácidos hidroxicinámicos conjugados con ácidos tartárico y málico en el rango de 2-163 mg/Kg peso fresco [13]. En frutas y vegetales, una fuente rica de ácido 5-O-cafeoilquínico son las manzanas, peras, duraznos, berenjena, alcachofa, papas y zanahorias con cantidades entre 15 y 2200 mg/Kg de peso fresco [12, 13]. Las semillas de café son una fuente rica de ácidos clorogénicos en la dieta, pudiendo alcanzar un consumo diario de 1 g para bebedores regulares [14, 15]. Los ácidos hidroxicinámicos libres son rápidamente absorbidos a través del tracto gastrointestinal [16, 17]. Mientras que los ésteres unidos a la pared celular son hidrolizados por esterasas digestivas antes de ser absorbidas [18]. Los ácidos hidroxicinámicos conjugados poseen una reducida capacidad de ser absorbidos por los enterocitos de la pared gastrointestinal. De esta forma, el ácido cafeico es cerca de 2-3 veces mejor absorbido en el tracto gastrointestinal superior que su forma ester, ácido 5-O-cafeoilquínico [19]. Esto probablemente refleja el aumento del

carácter hidrofílico de los ésteres de ácido quínico, responsable de alterar la permeabilidad a través del epitelio gastrointestinal [20]. Sin embargo, el ácido 5-O-cafeoilquínico puede ser absorbido en una pequeña fracción en el duodeno, con menos del 0,1 μM de concentración plasmática detectada en ratas luego de una infusión gástrica de 2,25 μmol de ácido 5-O-cafeoilquínico [16].

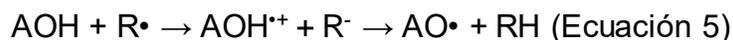
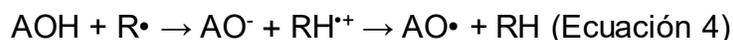
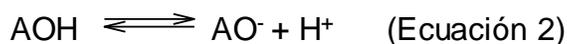
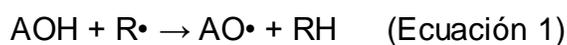
Estos metabolitos se encuentran en el plasma y orina mayormente conjugados con sulfatos y ácido glucorónico, y en menor proporción en su forma libre, de los ácidos cafeico, ferúlico, isoferúlico, m- y p-cumáricos, dihidrocafeico, dihidroferúlico, dimetoxicinámico, cafeoilquínico y feruloilquínico, así como lactonas de los ácidos cafeoilquínico y feruloilquínico [21].

Además de los ácidos hidroxicinámicos y las formas intactas de ácidos clorogénicos, también se ha detectado en el plasma tanto en sus formas libres como conjugadas los ácidos dihidrocafeico y dihidroferúlico con picos de concentración hasta 550 nM, alcanzadas 5-8 horas posterior al consumo de café [22].

Se han descrito numerosas propiedades biológicas para sus derivados naturales y sintéticos. Esta tesis se ha centrado en el estudio de derivados del ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico) y ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico), cuyas propiedades farmacológicas han sido estudiadas destacando su actividad como antioxidantes [2, 4, 5], antibacterianos [8], antiinflamatorios [7], anticancerígenos [9, 10], entre otras.

En cuanto a sus propiedades antioxidantes, la estructura química de los ácidos hidroxicinámicos le permite apagar radicales libres ($\text{R}\cdot$), actuando como antioxidantes que interrumpen las reacciones radicalarias en cadena (*“chain-breaking antioxidants”*). En general, existen dos mecanismos de reacción en el apagamiento de radicales [23]: **(I)** El grupo fenólico (-OH) puede donar un átomo de hidrógeno (mecanismo HAT) (Ecuación 1) o **(II)** un electrón (mecanismo ET) (Ecuación 2 y 3), por consiguiente se forma un radical fenoxilo ($\text{AO}\cdot$) que se estabiliza por resonancia. La última vía podría ser descrita por la cesión secuencial de un protón seguida de una transferencia electrónica (Ecuación 4), o por una

transferencia electrónica seguida de una cesión de un protón (Ecuación 5). Se ha identificado que el mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno ocurre preferentemente en solventes apolares, mientras que el mecanismo de transferencia de electrones tendría lugar en solventes polares, siendo dependiente del pH del medio.



La entalpía de disociación de enlace (*Bonding Dissociation Enthalpy*, BDE) del enlace O-H en un antioxidante, cuyo valor da cuenta de la facilidad con la que se transfiere un átomo de hidrógeno, y el potencial de ionización (IP), que caracteriza la facilidad con que se transfiere un electrón, son parámetros relacionados con la estructura química del polifenol y son determinantes en la eficacia de un compuesto como antioxidante. Un sustituyente electrodonor mesomérico (**M+**) (hidroxilo, metoxilo) en posición orto- o para- a un fenol disminuyen tanto la BDE como la IP, mientras que un grupo electroattractor (**M-**) (carboxilato, ester, nitro) aumentan la BDE y la IP [24]. Basado en esto, se podría concluir que un aumento en el número de grupos hidroxilos llevaría a una mejor actividad antioxidante, debido al efecto electrónico M+ y su capacidad donora de átomos de hidrógeno. Sin embargo, una disminución en la IP favorece la transferencia electrónica entre el antioxidante y el oxígeno, pudiendo facilitar eventos pro-oxidantes. Los grupos catecoles, poseen bajas BDEs, pero altos

valores de IP [25]. La actividad antioxidante superior se explica por la elevada estabilización por resonancia del radical fenoxilo ($\text{AO}\cdot$) y además por la factibilidad de formar puentes de hidrógenos intramoleculares que pueden existir en los grupos catecoles y pirogaloles.

Estudios electroquímicos de AHC [4, 26] han demostrado que ejercen su actividad antioxidante mediante un mecanismo de transferencia electrónica que puede tener lugar con la abstracción del átomo de hidrógeno. Para los catecoles, se ha observado que la transferencia de dos electrones por molécula se conduce mediante la formación de un intermediario radicalario *orto*-hidroxifenoxilo (transferencia del primer electrón) y *orto*-quinona (transferencia del segundo electrón). Se ha propuesto un producto de dimerización que resulta del acoplamiento de estos productos de oxidación [27]. También se ha reportado que estos radicales fenoxilos $\text{AO}\cdot$ podrían ser reducidos a sus fenoles originarios [28]. La correlación que se ha encontrado entre la actividad antioxidante y los potenciales de oxidación (E_{PA}) de los AHC es un indicador de que este parámetro podría considerarse como una medida de la actividad antioxidante [4]. Mientras mayor es el número de grupos hidroxilos en el anillo aromático, menor es el E_{PA} , mientras que los grupos metoxilos en lugar de los grupos hidroxilos en el anillo aromático desplazan los potenciales de oxidación a valores mayores. La cadena lateral del tipo estirénica, constituida por un doble enlace conjugado con el anillo aromático, afecta notablemente los E_{PA} de los AHC. La presencia de la cadena insaturada (-CH=CH-) que une al grupo carboxílico con el anillo bencénico en los AHC contribuye a una mayor deslocalización por resonancia de los radicales originados y favorece a la estabilización del $\text{AO}\cdot$, al disminuir además la BDE del enlace O-H [24]. Por ejemplo, la BDE del enlace O-H en el ácido cafeico es de 69,6 Kcal/mol y para su análogo con el grupo carboxílico unido directamente con el anillo bencénico (ácido protocatéquico), la BDE aumenta a 72,9 Kcal/mol [29].

En cuanto a esta propiedad antioxidante que manifiestan los AHC, es destacable la acción protectora frente a la oxidación de membranas celulares, sin

provocar toxicidad en las células [30, 31]. Dada la heterogeneidad propia de los sistemas biológicos, la actividad antioxidante se ve afectada en su acción y eficacia. Tanto compuestos hidrofílicos como lipofílicos ejercen su función antioxidante en sitios respectivos. Los antioxidantes lipofílicos se distribuyen preferentemente en el interior de membranas y lipoproteínas, embebidos en dominios lipídicos, como la vitamina E [32] y el β -caroteno [33], y su movilidad está determinada por la estructura química y física del ambiente en que están inmersas. Los antioxidantes hidrofílicos, como el ácido ascórbico, ácido úrico y el glutatión, ejercen su acción de *scavenging* de especies reactivas principalmente en el medio acuoso o interactuando con las membranas [34, 35]. Este aspecto es relevante al tratar los procesos de lipoperoxidación en membranas biológicas, donde los antioxidantes deben presentar una apropiada liposolubilidad para incorporarse en la bicapa lipídica y reaccionar con las especies reactivas ahí producidas [36]. Es así como se han sintetizados derivados del tipo éster y amida de ácido cafeico y ferúlico [37], donde se ha observado que los derivados éster son más activos que sus homólogos amida, y éstos mayor que los ácidos originales, debido a la mayor lipofilia, evidenciando que los derivados esterificados son mejores antioxidantes que evitan la lipoperoxidación. Además, la presencia de un doble enlace entre el anillo bencénico y el carbonilo aumenta la capacidad antioxidante de estos derivados pese a poseer lipofilias similares con sus respectivos análogos saturados.

Un modelo apropiado para el estudio del proceso de peroxidación lipídica y de reparto en sistemas microheterogéneos son los liposomas, que corresponden a vesículas esféricas microscópicas cuyo diámetro está en la escala nanométrica (frecuentemente entre 20 – 500 nm) formadas por una o más bicapas de fosfolípidos concéntricamente, presentando alta estabilidad química y física, dependiente entre otros factores, del tamaño del liposoma y del grado de insaturaciones [38]. Las moléculas con carácter hidrofílico pueden ser encapsuladas en el interior acuoso o interactuar con la bicapa lipídica mediante interacciones no específicas; mientras que en el caso de las moléculas hidrofóbicas pueden incorporarse entre las cadenas alquílicas de la bicapa lipídica [36]. Las bicapas de los liposomas pueden presentar variabilidad en la permeabilidad, a causa del largo de las cadenas alquílicas de los

ácidos grasos constituyentes y de la presencia de insaturaciones [39], donde la baja polaridad de algunas moléculas conduce a la partición entre la fase lipídica/medio acuoso, propiedad que permite una mayor permeabilidad hacia el interior acuosa en comparación con moléculas de mayor polaridad; y por lo tanto, solutos muy polares son muy poco permeables. Basados en estas propiedades, los liposomas han servido como modelo de estudio de la bicapa lipídica de membranas celulares [40], ya que ambos poseen composición de fosfolípidos, forma, propiedades físicas y químicas similares [30], lo que permitiría la extrapolación de los resultados obtenidos en liposomas a las membranas celulares [31]. El estudio del reparto en liposomas tiene la ventaja de asimilar de mejor manera la composición de las biomembranas y su inhomogeneidad estructural a través de la bicapa; mientras el reparto en un sistema n-octanol/medio acuoso consiste en un proceso de partición entre dos fases isotrópicas, la anisotropía en una bicapa lipídica y su alta razón superficie/volumen conducen a un proceso de sorción más complejo; además, el grado de partición de especies cargadas en membranas biológicas es subestimado en el sistema n-octanol/agua en comparación con el sistema liposoma/agua.

La vulnerabilidad de las membranas de fosfolípidos compuestas por ácidos grasos insaturados a ser dañadas con ROS se relaciona con propiedades fisicoquímicas de la bicapa y la reactividad química de las cadenas alquílicas que componen la membrana [41]. La primera propiedad se relaciona con el hecho que el oxígeno y los radicales libres sin carga son más solubles en la bicapa lipídica que en la fase acuosa. La solubilidad del oxígeno es 20 a 30 veces mayor en la fase lipídica que en la fase acuosa [42], haciéndola propensa para comenzar reacciones en un ambiente lipídico, donde también incrementa su reactividad en comparación con el medio acuoso circundante [43]. Por otro lado, simulaciones en dinámica molecular han mostrado que los radicales hidroxilos ($\text{HO}\cdot$) e hidroperoxilo ($\text{HOO}\cdot$) son capaces de penetrar en el interior de las membranas, teniendo acceso a los sitios de potencial peroxidación en las cadenas hidrocarbonadas [44]. Al ser el radical hidroxilo de corta vida, su estado estacionario es conseguido como resultado de procesos competitivos de generación del radical y *scavenging*, y no es producto de una distribución por equilibrio a largas distancias. El radical hidroxilo difunde en

solución acuosa vía reacciones de transferencia de hidrógeno con moléculas de solvente (H_2O) [45], por lo que su difusibilidad es elevada. La solubilidad de otras ROS tales como superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es menor en la bicapa lipídica, siendo mayor en la fase acuosa.

En la bicapa lipídica, los radicales libres son capaces de inducir peroxidaciones en fosfolípidos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) [46]. Los PUFAs son componentes esenciales de las membranas celulares de eucariontes, pero, al mismo tiempo, son extremadamente sensibles a la oxidación [47]. En comparación con otros procesos, la peroxidación de los PUFAs es mayoritariamente por autopropagación, es decir, a reacciones radicalarias en cadena [48] (**Figura 3**). En general, las reacciones de peroxidación lipídica ocurren en tres etapas: iniciación, propagación y término (Figura 2). La etapa de iniciación ocurre entre el radical hidroxilo y la cadena hidrocarbonada poliinsaturada, lo que genera un radical lipídico ($L\cdot$), el cual reacciona con oxígeno molecular para formar un radical peroxilo del lípido ($LOO\cdot$). La etapa de propagación ocurre cuando un radical $LOO\cdot$ abstrae un átomo de hidrógeno de un cadena hidrocarbonada vecina, produciendo un hidroperóxido lipídico relativamente estable ($LOOH$) y un segundo radical lipídico [46].

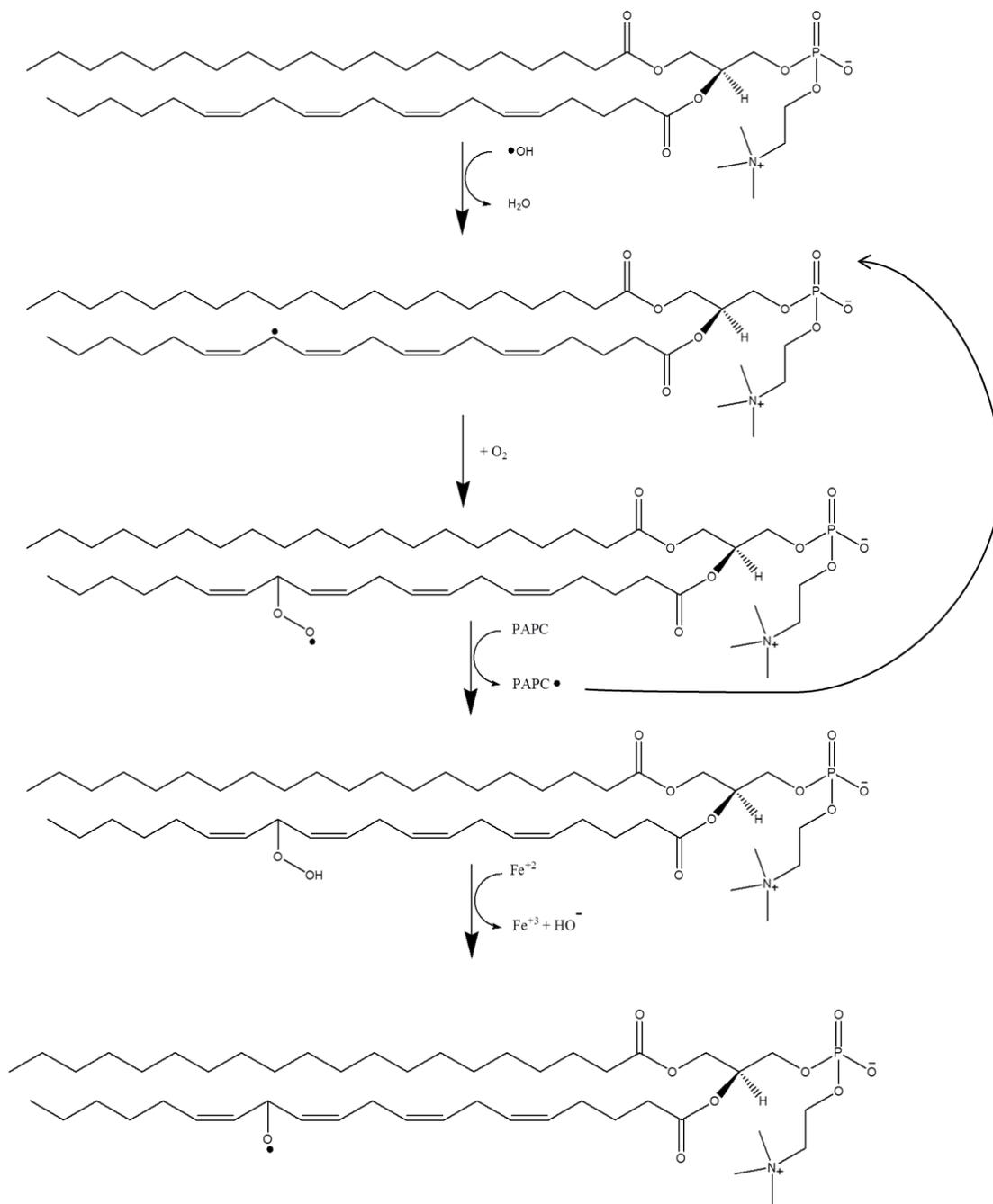


Figura 3 Esquema de las reacciones de lipoperoxidación del fosfolípido 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-fosfatidilcolina (PAPC) con el radical hidroxilo en un medio aeróbico. En una primera etapa el radical hidroxilo abstrae un átomo de hidrógeno de un carbono vinílico, el radical centrado en carbono generado (PAPC•) reacciona rápidamente con oxígeno produciéndose el radical peroxilo, el cual es capaz de abstraer un átomo de hidrógeno de otra molécula de PAPC vecina, regenerándose el radical PAPC• y el hidroperóxido correspondiente, el que además puede descomponerse a radical alcoxilo catalizada por iones ferrosos. La reacción en cadena finaliza cuando dos especies radicalarias reaccionan entre sí o por acción de alguna especie inhibitoria de la autooxidación (especie antioxidante).

Los fosfolípidos oxidados que resultan son capaces de modificar las funciones y propiedades físicas de la membrana, incluyendo su fluidez, permeabilidad a diferentes solutos, grosor de la bicapa, y el empaquetamiento de los lípidos y proteínas en la membrana [49].

En general, las cabezas de los fosfolípidos no son afectadas por las reacciones de peroxidación. Sin embargo, estas cabezas podrían influir en la velocidad de peroxidación, como se ha mostrado en estudios con liposomas [49]. Hay evidencia experimental y teórica que la descomposición del H₂O₂ es acelerada en la superficie de las membranas de fosfolípidos [50, 51].

Asimismo, se ha estudiado el rol protector ejercido por ácidos cinámicos en modelos de membrana, donde se ha postulado que la actividad antioxidante de éstos es dependiente de sus características estructurales, su localización en la membrana, su interacción con las cabezas polares de los fosfolípidos en la interfase lípido/agua [4].

Otros modelos de membrana de mayor complejidad que los liposomas son los fantasmas de eritrocitos, cuya composición de fosfolípidos y proteínas integrales de membrana [52] es una aproximación estructural más cercana a las membranas celulares. Y por otro lado, al carecer del contenido citoplasmático, conforman un modelo apropiado para el estudio de membranas lipídicas [53, 54]. Miki y *col.*[54] oxidaron fantasmas de eritrocitos con AAPH y comprobaron que al incubarse junto con α -tocoferol, este antioxidante disminuye la oxidación de los fosfolípidos, pero no evita la oxidación y agregación de las proteínas de membrana.

A nivel celular, la oxidación de membranas se ha asociado a un mayor ingreso de calcio al citoplasma en células endoteliales vasculares humanas [55] de la línea EA.hy926, lo cual es un indicador patofisiológico del estado intracelular, pues se relaciona con alteraciones como la infiltración transendotelial de leucocitos activados, reacciones de rechazo a transplantes, entre otras [56]. En este ámbito, estudios con productos naturales como la miel, la cual contiene altos contenidos de crisina (un flavonoide) y cafeato de etilfenilo o CAPE (un ácido hidroxicinámico),

disminuyendo la peroxidación lipídica y aumentando los niveles de GSH endotelial [57]. También procianidinas de las semillas de *Vitis vinífera* L. inhiben la peroxidación lipídica generada por AAPH y revierten los efectos de disminución de la viabilidad en EA.hy926 [58].

Por otra parte, es cada vez más aceptado que los polifenoles posean, además de propiedades antioxidantes, potencial actividad oncoprotectora y anticancerogénica, que puede ocurrir principalmente por su capacidad de *scavenging* de radicales libres [22], ya que las especies reactivas de oxígeno están implicadas en la iniciación y progresión tumoral. Aunque los efectos antioxidantes pueden ser los mecanismos más relevantes, vías adicionales pueden estar implicadas en la actividad antitumoral de los compuestos polifenólicos [59-61], tales como la inducción de la apoptosis, inhibición del ciclo celular [62], efectos antiinflamatorios [63], supresión de la activación del factor NF- κ B y supresión de la angiogénesis. En consecuencia, existen múltiples dianas moleculares potenciales, incluyendo la modulación de enzimas específicas y los procesos de transducción de señales que conducen a la detención de la proliferación celular, la regulación del ciclo celular, la inhibición de la síntesis de ADN, o la inhibición de la angiogénesis y metástasis [23]. Algunos estudios sugieren que la capacidad de estos compuestos contra el cáncer también puede relacionarse con la inducción o la inhibición de proteínas supresoras de la apoptosis en diversas líneas celulares de cáncer, incluyendo las células de cáncer de mama, de cérvix uterino, entre otras [24]. En células leucémicas mieloblásticas humanas de la línea HL-60 el ácido hidroxicinámico CAPE presentó efectos antiproliferativos e inhibición en la síntesis de ADN y ARN a concentraciones $\geq 10 \mu\text{M}$ [62]. Inhibiendo la proliferación celular a $77,3 \pm 3,3 \%$ a concentraciones $\geq 6 \mu\text{g/mL}$ luego de 48 h de incubación [64].

Además, algunos ácidos fenólicos pueden tener efectos citotóxicos en células cancerígenas a causa de sus propiedades pro-oxidantes. De hecho, los fenoles pueden generar radicales libres por reciclaje redox, el que está asociado con su habilidad para modular la expresión de genes o inhibir factores reguladores

de la transcripción. La actividad pro-oxidante depende de su estructura, dosis, molécula target y ambiente [25].

Por mucho tiempo se ha reconocido que existen diferencias en el metabolismo del hierro en las células neoplásicas en comparación con las células normales. Las células malignas demuestran un gran aumento en el requerimiento de hierro como resultado de su rápida división celular [26-28]. El hierro es un elemento traza envuelto en numerosos procesos metabólicos y por ende es indispensable para la vida de la célula. Casi todos los organismos requieren hierro como micronutriente, siendo necesario para la biosíntesis de macromoléculas, división celular y proliferación, y también está relacionado con diversos procesos celulares como la obtención de energía, el transporte de oxígeno y la biosíntesis de ADN [65]. En humanos, la cantidad de hierro celular se mantiene en niveles constantes, estimándose en aproximadamente 4 gramos. El hierro citoplasmático se puede encontrar en forma heme (como en los complejos porfirínicos) en las hemoproteínas, donde representa alrededor del 80% del hierro celular total; y en formas no-heme distribuidas entre proteínas de almacenaje (ferritina y hemosiderina) y proteínas de transporte (transferrina y ferroportina). La homeostasis del hierro es un proceso altamente controlado donde su desregulación, tanto por deficiencia o sobrecarga, es dañino para la célula. Las células tumorales poseen altos niveles de hierro intracelular, lo cual se correlaciona con la sobreexpresión de receptores de transferrina 1 (TfR1) los cuales están encargados de la internalización del hierro acompañado a transferrina [Transferrina-(Fe³⁺)₂] desde la sangre hacia los compartimientos intracelulares (**Figura 4**) [66]. La síntesis de proteínas relacionadas con el almacenamiento y eliminación del hierro intracelular (STEAP3, ferritina y ferroportina) está alterada en numerosas células tumorales [67], esto provoca que los niveles de hierro libre lábil (LIP, *labil iron pool*) sean exacerbados en estas células. El LIP es una fuente de hierro de disponibilidad inmediata para ser empleada en los diversos procesos celulares tales como las divisiones celulares aceleradas que tienen lugar en este tipo de células. Este evento hace factible la interacción con quelantes con actividad redox que pudiesen fomentar altos niveles de ROS. Además las células tumorales son más sensibles

que las células sanas a la carencia de hierro, pudiendo incluso inducir arrestos en los estados G1/S del ciclo celular y por lo tanto, detener el avance proliferativo [68]. En células HL-60 el uso de desferroxamina, un potente quelante del hierro férrico ($\log\beta = 30,6$ [69]), promueve la detención del ciclo celular en el estado S y la apoptosis en un 60% de las células [70]. Por otro lado, las células tumorales son más sensibles a los niveles aumentados de ROS que las células normales, debido a sus niveles de ROS basales más elevados [65, 71]. De hecho, niveles bajos de ROS facilitan la génesis de tumores, mientras que niveles altos inducen la muerte celular [71].

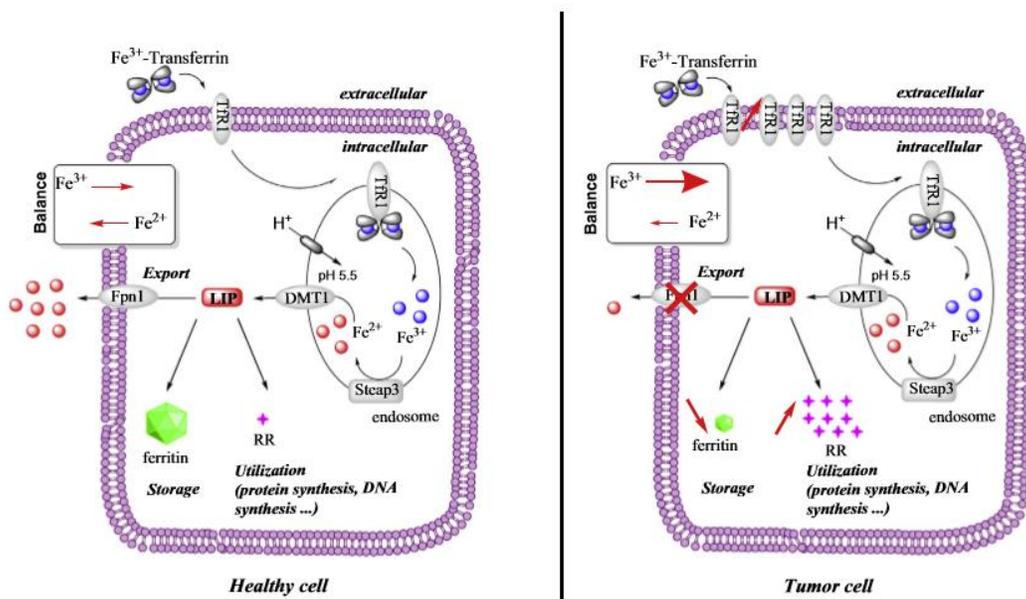


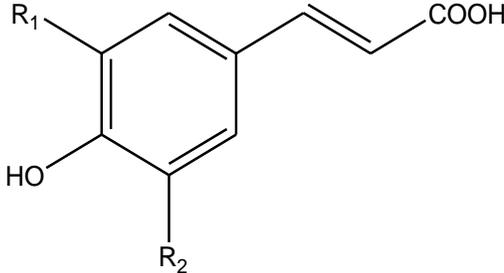
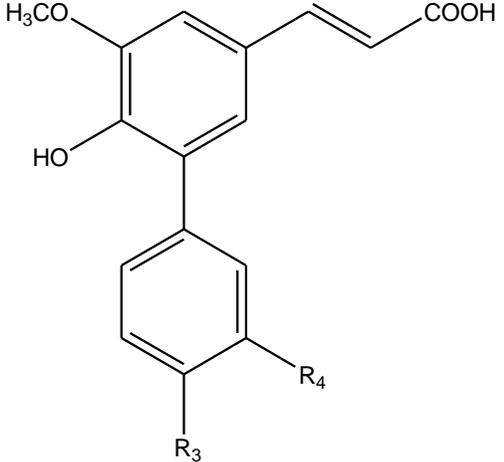
Figura 4 Transporte celular del hierro [68]. *Fpn1*: Ferroportina tipo 1; *TfR1*: Receptor de transferrina tipo 1; *LIP*: Pool de hierro lábil; *DMT1*: Transportador de metales divalentes tipo 1; *Steap3*: ferrireductasa (Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate-3); *RR*: ribonucleótidos reductasa.

Propósito.

En este trabajo se estudian 2 antioxidantes naturales (ácido cafeico, AC1, y ácido ferúlico, AC2) y 10 antioxidantes sintéticos (AC3-AC12) derivados de la familia de los ácidos cinámicos (**Tabla I**) los cuales son estudiados mediante metodologías electroquímicas, de fluorescencia por ORAC-FL y de EPR, donde son caracterizados sus radicales libres y evaluadas sus reactividades frente al radical hidroxilo y alcoxilo; además se obtienen los parámetros de logP, logD y pH de cada molécula. Dentro de esta serie se seleccionan 4 compuestos según las mediciones de citotoxicidad en células, escogiendo tres compuestos (AC1, AC3, AC5) que exhiben baja citotoxicidad en EA.hy 926 y alta toxicidad en HL-60; y un compuesto (AC7) que presenta la mayor citotoxicidad de la serie en EA.hy 926 y baja toxicidad en HL-60. En estos compuestos se determina su localización relativa en liposomas y membranas de eritrocitos, y también, el efecto protector frente al radical hidroxilo en el medio microheterogéneo.

Además se incluye el compuesto ácido 3,4-dihidroxi-5-nitrocínámico (AC13), que posee un grupo fuertemente electroattractor en la posición 5 con el propósito de evaluar el efecto que tiene este grupo en la actividad antioxidante en medio homogéneo.

Tabla I. Estructuras de los compuestos estudiados derivados de ácido 4-hidroxicinámico.

Estructura	Sigla	Compuesto			
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
	AC1	OH	H	-	-
	AC2	OCH ₃	H	-	-
	AC3	OH	OH	-	-
	AC4	OCH ₃	Br	-	-
	AC5	OH	Ph	-	-
	AC13	OH	NO ₂	-	-
	AC6	-	-	H	H
	AC7	-	-	OCH ₃	OCH ₃
	AC8	-	-	OCH ₃	H
	AC9	-	-	Cl	H
	AC10	-	-	F	H
	AC11	-	-	NO ₂	H
	AC12	-	-	CH ₃	H

2. Hipótesis

En los ácidos hidroxicinámicos, la incorporación de grupos con efecto electrónico atractor en la vecindad del centro de reacción (grupo 4-hidroxilo del anillo bencénico), aumentaría la reactividad del grupo hidroxilo, traduciéndose en una mayor actividad antioxidante; en comparación con moléculas que incorporen grupos con efecto electrónico donador, que presentarían una menor actividad antioxidante. En sistemas microheterogéneos como liposomas y membranas de eritrocitos, la actividad antioxidante debiese verse afectada por la lipofilia de las moléculas.

El efecto citotóxico en células leucémicas de estos nuevos derivados podría transcurrir mediante un mecanismo prooxidante, el que sería dependiente tanto de la estructura química como así también de la concentración y presencia de iones férricos en el sistema.

3. Objetivos generales

Evaluar la capacidad antioxidante de los ácidos hidroxicinámicos frente a distintas especies reactivas de una nueva familia de derivados de ácido cinámico, tanto en sistemas homogéneos, microheterogéneos y celulares.

Evaluar el efecto citotóxico en células leucémicas de esta nueva familia de derivados de ácido hidroxicinámico.

4. Objetivos específicos

1. Determinar los mecanismos de oxidación de los derivados AHC (empleando VC y VPD).
2. Caracterizar la generación de las especies radicalarias en la oxidación electroquímica de los derivados de AHC, mediante Espectroscopía Paramagnética Electrónica (EPR).
3. Analizar la capacidad de *scavenging* del radical peroxilo y alcoxilo mediante la técnica de ORAC-FL de los AHC.
4. Analizar la capacidad antioxidante de los AHC frente al radical alcoxilo en medio homogéneo mediante la técnica de ORAC-EPR
5. Evaluar la citotoxicidad de estos compuestos AHC en células endoteliales EA.hy 926 mediante la metodología de reducción MTT.
6. Evaluar el efecto tóxico en células HL-60 mediante la técnica de reducción de MTT.
7. Determinar el grado de lipofilia en liposomas y en un sistema octanol/agua de los AHC.
8. Determinar el efecto protector de los AHC frente a la lipoperoxidación en un sistema microheterogéneo compuesto por vesículas, liposomas y en membrana de eritrocitos.
9. Evaluar el efecto antioxidante de los AHC en células de EA.hy 926 empleando como estresores menadiona y AAPH.
10. Evaluar el efecto de los derivados de AHC en un sistema homogéneo tipo Fenton, mediante la técnica de spin-trapping.
11. Determinar el efecto antioxidante/pro-oxidante en células de HL-60 mediante *spin-trapping*.

5. Metodologías.

5.1 Voltamperometría cíclica y de pulso diferencial.

En la voltamperometría cíclica (VC), el electrodo de trabajo está inmerso en la muestra y se realiza un barrido de potencial en la dirección anódica (valores de potencial positivo). Durante este barrido, el potencial del electrodo de trabajo se vuelve gradualmente positivo, y la potencia oxidante del electrodo aumenta. Cuando el potencial del electrodo alcanza el potencial de oxidación específico del compuesto, ocurre la generación de un pico de oxidación. Este proceso de oxidación es registrado como una curva corriente-potencial denominado voltamperograma. Cuando el potencial alcanza un valor final, se invierte la dirección del barrido y el potencial se realiza en la dirección catódica (valores de potencial negativo). Durante el barrido de vuelta, el potencial del electrodo de trabajo se vuelve gradualmente más negativo, y la potencia reductora del electrodo aumenta. La presencia o ausencia de un pico catódico en el barrido de vuelta entrega información acerca de la reversibilidad de la reacción redox del compuesto oxidado durante el barrido de oxidación.

Además, se empleó la metodología de voltamperometría de pulso diferencial (VPD), en la cual se realizan pequeños pulsos de amplitud constante (10-100 mV) superpuestos en una onda en forma de ascendente. La corriente es medida dos veces durante cada pulso, la primera medición se realiza al comienzo del pulso de potencial aplicado, y el segundo al final del mismo pulso. La medición de corriente que es entregada por el instrumento, corresponde a la diferencia entre las corrientes medidas en cada pulso aplicado.

Las metodologías de VC y VPD son comúnmente empleadas para el estudio de la capacidad antioxidante de diversos compuestos ya que permite la evaluación de la habilidad de estos compuestos para donar electrones. Es así como un potencial de oxidación menor, es un indicador de que el compuesto se oxida con mayor facilidad; y que por lo tanto, presentaría mayor capacidad antioxidante según este ensayo.

En este trabajo, los derivados de ácido cinámico fueron estudiados electroquímicamente a través de la técnica de voltamperometría cíclica en un medio mixto tampón fosfato 0,1 M pH 7,4: Metanol (70:30), este medio fue seleccionado pues permite la solubilización de todos los compuestos estudiados. Los electrodos empleados fueron carbón vítreo (trabajo), plata/cloruro de plata (referencia) y platino (auxiliar). Se trabajó a temperatura ambiente y en condiciones aerobias sin purga de nitrógeno. Estas condiciones experimentales fueron empleadas también en los ensayos de voltamperometría de pulso diferencial.

La voltamperometría cíclica tiene la ventaja de permitir el análisis mecanismos electroquímicos de compuestos electroactivos mediante simples criterios empleando parámetros fácilmente obtenibles de un voltamperograma [72].

Existen dos componentes principales que determinan las reacciones que pueden ocurrir en la interfase electrodo/solución: (i) el transporte difusional de masa de la especie electroactiva desde el seno de la solución hacia la interfase del electrodo y (ii) la transferencia heterogénea de carga entre el analito y el electrodo, además en algunos casos pueden ocurrir además reacciones químicas acopladas a algunos de estos procesos.

En función de estos componentes, los sistemas pueden ser clasificados como reversibles, irreversibles o cuasi-reversibles [73]:

- **Sistemas reversibles:** En un sistema reversible, la velocidad de reacción de transferencia de carga es elevada (constante de velocidad superior a 10^{-1} cm^{-1}) y la etapa de transporte de masa apenas controla el proceso, es decir, la reacción ocurre a una velocidad

suficientemente alta para establecer un equilibrio dinámico en la interfase del electrodo.

La intensidad de corriente de pico (I_p) se relaciona con la concentración (C_0) y la velocidad de barrido (v) mediante la ecuación de Randles-Sevcik **(Ecuación 6)**:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0 v^{1/2} \quad \textbf{(Ecuación 6)}$$

Donde n es el número de electrones envueltos en el proceso, A es el área del electrodo (cm^2), C_0 es la concentración de la especie en la solución (mol cm^{-3}), D_0 es el coeficiente de difusión (cm^2s^{-1}) y v es la velocidad de barrido (V s^{-1}). Para sistemas considerados reversibles, en un determinado rango de velocidades de barrido de potencial, los criterios de reversibilidad que deben considerarse son:

- La razón de corriente $I_p/v^{1/2}$ varía linealmente con la v .
- La razón de corrientes de pico anódico y catódico (I_{pa}/I_{pc}) debe ser igual o aproximarse a 1,0 y ser independiente de la velocidad de barrido.
- En cuanto al potencial del barrido de ida, debe ser independiente de la velocidad de barrido. La diferencia de potenciales del barrido de ida y vuelta (llamado *diferencia de potencial de pico a pico*), ΔE_p , a 25°C , debiese ser $59/n$ (n = número de moles de electrones intercambiados por mol de especie electroactiva).

El parámetro de razón de corrientes puede ser estimado a partir de la ecuación descrita por Nicholson y Shain [74] **(Ecuación 7)**:

$$\frac{I_{PA}}{I_{PC}} = \frac{(I_{PA})_0}{I_{PC}} + \frac{0,485 \times I_{switching}}{I_{PC}} + 0,086 \quad \textbf{(Ecuación 7)}$$

Donde $(I_{pa})_0$ es la corriente de pico anódico medida desde el eje $Y=0$, y $I_{switching}$ es la corriente de viraje en el barrido de ida y barrido de vuelta, medido desde el eje $Y = 0$.

- **Sistemas irreversibles:** En estos tipos de sistemas, la velocidad de transferencia de carga es lenta comparada con la velocidad de barrido de potencial, así las concentraciones de las especies oxidadas y reducidas no serán función del potencial, de forma que no se exhibe un comportamiento que siga la ecuación de Nernst. En estas condiciones, la ecuación que describe la corriente de pico es afectada por el coeficiente de transferencia (α) **(Ecuación 8)**.

$$I_p = (2,99 \times 10^5) n(\alpha n_\alpha)^{1/2} A D_0^{1/2} C_0 v^{1/2} \quad \text{(Ecuación 8)}$$

Donde n_α es el número de electrones transferidos hasta la etapa determinante de la velocidad y n es el número de electrones totales transferidos, A es el área del electrodo (cm^2), C_0 es la concentración de la especie electroactiva en la solución (mol cm^{-3}), D_0 es el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), v es la velocidad de barrido de potencial (V s^{-1}), α es el coeficiente de transferencia o coeficiente de asimetría.

En estos sistemas se acostumbra ver sólo el pico anódico y ausencia del pico en el barrido catódico. Este pico se desplazado con los cambios de la velocidad de barrido.

Para los sistemas irreversibles los criterios que se deben considerar son:

- La ausencia del pico (catódico) durante el barrido en el sentido inverso.

- Existe una relación lineal entre la corriente de pico y la velocidad de barrido. Esta observación está asociada a procesos de adsorción de la especie electroactiva en la superficie del electrodo [75].
- El potencial de pico varía con la velocidad de barrido. Por un aumento de 10 veces de la velocidad de barrido, E_p se desplaza $(0,03/\alpha n)$ Volts en la dirección catódica; es decir, existirá una relación lineal entre el potencial de pico y el logaritmo de la velocidad de barrido.
- La expresión $|E_p - E_{p/2}| = (48/\alpha n)v$ es aplicable para estos sistemas. Donde $E_{p/2}$ es el valor del potencial que se determina a la mitad del valor de la corriente de pico I_p .
- **Sistemas cuasi-reversibles:** En una reacción electródica cuasi-reversible, la corriente es controlada tanto por la etapa de transporte de masa como por la etapa de transferencia de carga, en este caso la ecuación de Nernst es aproximadamente cumplida. Generalmente en estos sistemas la reacción puede ser reversible a velocidades de barrido bajas e irreversible a velocidades de barrido altas, de modo que el proceso cuasi-reversible es observado en valores de velocidad intermedios. Una característica común que puede observarse en los sistemas cuasi-reversibles es una separación creciente entre E_{pa} y E_{pc} a medida que ocurre un aumento de la velocidad de barrido, vale decir, ΔE_p varía con el aumento de la v .

Tabla II. Resumen con los principales criterios de diagnóstico para los diferentes tipos de sistemas estudiados por VC.

	Procesos reversibles	Procesos cuasi-reversibles	Procesos irreversibles
1	$\frac{I_{PA}}{I_{PC}} = 1$	$\frac{I_{PA}}{I_{PC}} = 1, si \alpha = 1$	Ausencia de pico en barrido de vuelta.
2	$I_p \sim v^{1/2}$	$I_p \sim v$	$I_p \sim v^{1/2}$
3	E_p es independiente de v	E_{PC} se mueve a valores negativos con aumento de v	E_p depende de v
4	$\Delta E_p = \frac{59}{n} mV$	$\Delta E_p > \frac{59}{n} mV$	$ E_p - E_{p/2} = \frac{48}{\alpha n} V$

- **Mecanismos electroquímicos acoplados a reacciones químicas.**

Muchas reacciones electródicas tienen lugar en la región entre el electrodo de trabajo y la solución de analito, o sea, en la región donde ocurre la transferencia electrónica. Estos procesos electródicos pueden ocurrir de numerosas formas lo que resulta en la obtención de diversos tipos de voltamperogramas cíclicos. Como la VC es una importante herramienta para estudios mecanísticos y cinéticos de reacciones redox que ocurren en la superficie electródica, se han descrito numerosos criterios de diagnóstico de mecanismos electroquímicos. En el estudio de los procesos electródicos la simbología empleada para la distinción de los diferentes procesos que pueden tener lugar en la interfase heterogénea son: E, que designa una etapa electroquímica del mecanismo y C para las reacciones químicas acopladas.

Tabla III. Principales mecanismos electródicos y algunos criterios de diagnóstico.

	Mecanismo	Criterios de diagnóstico
I	<p>Transferencia electrónica reversible.</p> $Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$	<ul style="list-style-type: none"> - E_p es independiente de v - $\Delta E_p = 59 \text{ mV/n}$ (a 25°C) - I_{pa}/I_{pc} es constante e igual a la unidad. - $I_{pc}/v^{1/2}$ es constante con v
II	<p>Transferencia electrónica irreversible</p> $Ox + ne^- \rightarrow Red$	<ul style="list-style-type: none"> - Desplazamiento de E_{pc} con v en el sentido catódico. - $I_{pc}/v^{1/2}$ es constante con el aumento de v. - Ausencia de la razón de corriente I_{pa}/I_{pc}.
III	<p>Transferencia electrónica cuasi-reversible</p> $Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$	<ul style="list-style-type: none"> - Desplazamiento de E_{pc} a potenciales más negativos con los aumentos de v. - ΔE_p es superior a 59 mV/n (incluso a valores bajos de v). - I_{pc} aumenta con $v^{1/2}$. - $I_{pc}/v^{1/2}$ puede no ser constante con el aumento de v.
IV	<p>Transferencia electrónica reversible seguida de una reacción química reversible- Mecanismo E_rC_r.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Desplazamiento de E_{pc} a valores más negativos con los aumentos de v. - Razón I_{pa}/I_{pc} se vuelve menor que 1 con el aumento de v.

	$Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$ $Red \rightleftharpoons Z$	<ul style="list-style-type: none"> - Función de corriente ($I_{pc}/v^{1/2}$) permanece invariable (aumenta ligeramente) con aumento de v.
V	<p>Reacción química reversible seguida de una transferencia electrónica reversible – Mecanismo CrEr.</p> $Z \rightleftharpoons Ox$ $Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$	<ul style="list-style-type: none"> - Desplazamiento de E_{pc} hacia potenciales menos negativos con los aumentos de v. - Función de corriente ($I_{pc}/v^{1/2}$) disminuye con los aumentos de v. - Razón I_{pa}/I_{pc} es siempre mayor que 1 y aumenta con v.
VI	<p>Reacción química irreversible seguida de una transferencia electrónica reversible – Mecanismo CiEr.</p> $Z \rightarrow Ox$ $Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$	<ul style="list-style-type: none"> - Como no está acompañado del pico reverso, no hay criterios que definan ese caso, excepto para la función de corriente ($I_{pc}/v^{1/2}$) que disminuye con el aumento de v.
VII	<p>Transferencia electrónica reversible seguida de una reacción química irreversible – Mecanismo ErCi.</p> $Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$ $Red \rightarrow Z$	<ul style="list-style-type: none"> - E_{pc} se desplaza hacia valores más negativos con el aumento de v. - Razón I_{pa}/I_{pc} tiende a 1 con el aumento de v. - Función de corriente ($I_{pc}/v^{1/2}$) permanece invariable (disminuye ligeramente) con el aumento de v.

VIII	<p>Transferencia electrónica reversible seguida de una regeneración irreversible del reactivo de partida – Mecanismo catalítico.</p> $Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$ $Red + Z \rightarrow Ox$	<ul style="list-style-type: none"> - Para un voltamperograma en forma de “S”, el potencial de medio pico ($E_{p/2}$) es independiente de v. En caso contrario, E_{pc} se desplaza a valores menos negativos. - Para el caso de onda sigmoideal, i_{pa}/i_{pc} es siempre igual a 1. - $i_{pc}/v^{1/2}$ aumenta significativamente con la disminución de v hasta alcanzar un valor máximo en el cual la función es independiente de v (forma una curva de formato “S”).
IX	<p>Transferencia electrónica irreversible seguida de una reacción de regeneración irreversible del reactivo de partida.</p> $Ox + ne^- \rightarrow Red$ $Red + Z \rightarrow Ox$	<ul style="list-style-type: none"> - Para un voltamperograma en forma de “S”, el potencial de medio pico ($E_{p/2}$) es independiente de v. En caso contrario, E_{pc} se desplaza a valores menos negativos. - Razón i_{pa}/i_{pc} no puede ser medida debido a la ausencia del pico en el barrido de regreso.
X	<p>Transferencia electrónica múltiple con intervención de una reacción química – Mecanismo ECE.</p> $Ox + n_1e^- \rightleftharpoons Red$ $Red \rightleftharpoons Y$	<ul style="list-style-type: none"> - Es difícil atribuir criterios para identificar cada tipo de mecanismo ECE. Usualmente, se hace la razón $i_{pc}/v^{1/2}$ en función de v para cada pico y se analiza la tendencia resultante separadamente.

	$Y + n_2 e^- \rightleftharpoons Z$	
XI	<p>Transferencia electrónica reversible seguida de una reacción química irreversible de desproporción – Mecanismos ErCi.</p> <p>$Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$</p> <p>$2 Red \rightarrow Z + Ox$</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Desplazamiento de E_{pc} a potenciales más negativos con el aumento de v. - Función de corriente ($I_{pc}/v^{1/2}$) disminuye con el aumento de v. - Aumento de la razón I_{pa}/I_{pc} con el aumento de v.

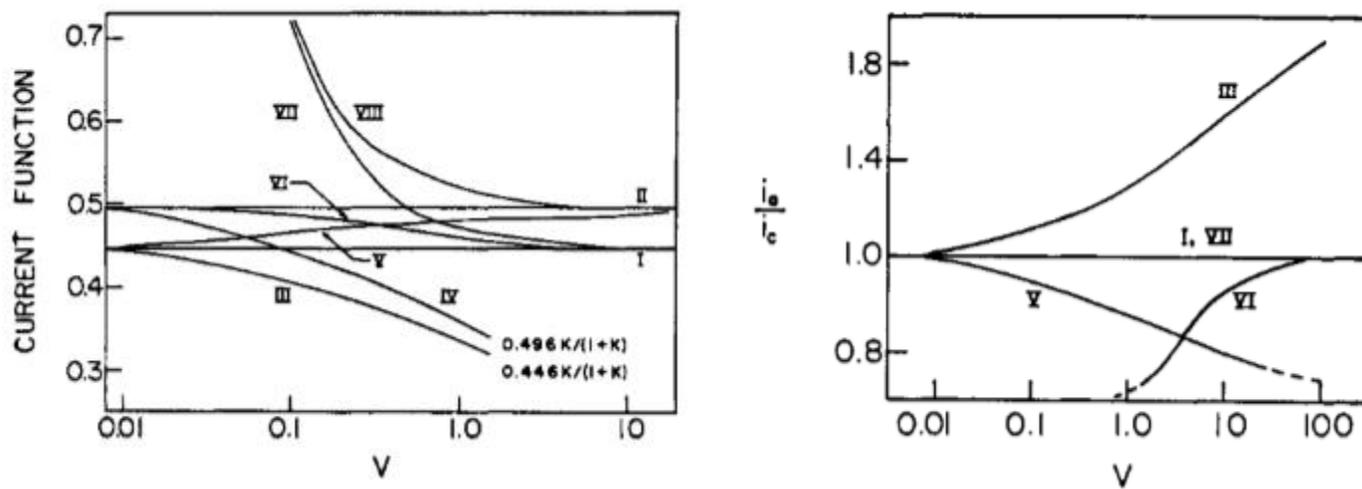


Figura 5 (Izquierda) Gráfico de la tendencia de la función de corriente ($I_p v^{-1/2}$) con las variaciones de velocidad de barrido de potencial (v) para cada mecanismo descrito con I-VIII. (Derecho) Tendencia de variación de la razón de corriente (I_{pa}/I_{pc}) con la velocidad para los mecanismos I, III, V, VI y VII.

Las reacciones electródicas son reacciones redox heterogéneas. Si su velocidad depende exclusivamente de la velocidad de transporte de masa, se habla de una reacción electródica controlada por transporte de masa. Si el mecanismo de transporte de masa es difusional, es decir, la transferencia de masa es espontánea a favor del gradiente de concentración, se habla de reacciones electródicas controladas por difusión. La mayoría de las reacciones electródicas que tienen lugar en VC proceden bajo control difusional, al controlar otros mecanismos de transporte de masa, como los de migración y convección. La migración se controla añadiendo un electrólito de soporte que es una sal inerte en el rango de potencial de trabajo y que se encuentra, por lo menos, en una relación 100:1 de concentración con respecto al analito. Los mecanismos de convección son anulados evitando la agitación en la solución y manteniendo la temperatura del sistema constante.

A partir de los valores de corriente de pico en función de la velocidad de barrido, es posible distinguir si un determinado proceso es controlado por difusión. Para procesos controlados por difusión se cumple la relación:

$I_p = (2,69 \times 10^5)n^{3/2}AD_0^{1/2}C_0v^{1/2}$, para reacciones de transferencia electrónica reversible.

$I_p = (2,99 \times 10^5)n(\alpha n_\alpha)^{1/2}AD_0^{1/2}C_0v^{1/2}$, para reacciones de transferencia electrónica irreversible.

Aplicando la función logarítmica sobre ambas relaciones se obtiene **(Ecuación 9)**:

$$\log(I_p) = \log(k) + \frac{1}{2}\log(v) \quad \textbf{(Ecuación 9)}$$

Donde k agrupa aquellos parámetros constantes en cada mecanismo.

La derivada con respecto a $\log(v)$, se logra la expresión **(Ecuación 10)**:

$$\frac{d(\log(I_p))}{d(\log(v))} = 0,5 \quad \textbf{(Ecuación 10)}$$

Si el valor de la pendiente de un gráfico de $\log(I_p)$ versus $\log(v)$ es próximo a 0,5 es indicador de un mecanismo de transferencia electrónica que es controlado por la difusión de la especie electroactiva. En caso que la pendiente es cercana a 1,0 se asocia a mecanismos de transferencia electrónica que están controlados por adsorción en la interfase electrodo/solución [76].

5.2 Caracterización de especies radicalarias generadas por oxidación electroquímica.

Los radicales de los compuestos derivados de AHC se obtuvieron por generación electroquímica *in situ* a las mismas condiciones experimentales de VC y VPD, en DMSO con 0,1 M de TBAP y en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). Para los compuestos catecólicos (AC1 y AC5) y el compuestos con anillo pirogalol (AC3), se obtuvo mejor resolución de los espectros empleando 0,1 M de cloruro de zinc, para los demás compuestos los radicales generados pudieron ser identificados con la adición de 200 mM de POBN/PBN. Los espectros EPR fueron obtenidos en un equipo Bruker ECS106 empleando la banda X (9,85 GHz) con una cavidad rectangular y modulación de la radiación de 50 kHz. Las constantes de acoplamiento hiperfino fueron estimadas con una precisión de 0,05 G. Los espectros experimentales fueron simulados con el programa WinSim.

Debido a que los electrones y ciertos núcleos, con espín nuclear distinto de cero ($I_n \neq 0$), poseen momentos magnéticos, estos pueden interactuar mediante interacciones dipolo magnético-dipolo magnético cuya interacción es proporcional al inverso del cubo de la distancia entre ellos [77, 78]. Además, en un orbital *s* la probabilidad de encontrar un electrón en el núcleo tiene un valor finito, provocando una singularidad en la interacción dipolo magnético-dipolo magnético. Esta singularidad puede ser tratada recurriendo a la interacción de contacto isotrópica de Fermi. Midiendo esta parte de la interacción mediante las constantes de acoplamiento hiperfino, se puede determinar la contribución de la densidad de espín en el orbital *s*. La ecuación de McConnell (**Ecuación 11**) relaciona el acoplamiento hiperfino del protón, ^1H , en radicales aromáticos, con la densidad de espín ρ_π en los átomos de carbono del esqueleto

$$a_H = Q \times \rho_\pi \quad \text{(Ecuación 11)}$$

Donde Q es una constante de proporcionalidad ($Q \sim -22,5 \text{ G}$). Esta relación da cuenta que la densidad de espín sobre un átomo de carbono en un radical

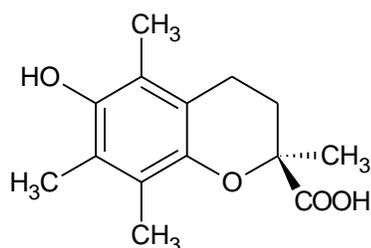
orgánico es proporcional a la constante de acoplamiento hiperfino asignada a aquel átomo.

5.3 ORAC-FL.

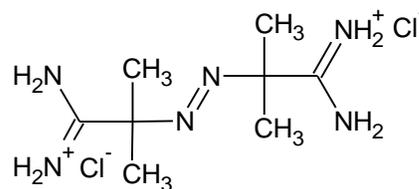
El método de capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC) con fluoresceína (3,6-dihidroxiestero[isobenzofuran-1-(3H), 9(9H)-xanten]3-ona) como sonda fluorescente, consiste en el monitoreo del decaimiento de la fluorescencia en el tiempo debido a la reacción entre la sonda y los radicales libres peroxilos generados a partir de la termólisis del AAPH (**Figura 6**). El radical peroxilo es un oxidante comúnmente encontrado en los sistemas biológicos; es menos reactivo que el radical hidroxilo, teniendo tiempos de vida media del orden de los segundos. Existiendo dos reacciones de competencia entre sí, de los radicales libres con la sonda y de los radicales libres con el antioxidante; el tiempo que demora en decaer completamente la fluorescencia está relacionado con la protección de la sonda a causa de los antioxidantes (**Figura 7**); de esta forma el efecto antioxidante de los compuestos es proporcional al área bajo la curva. Los valores obtenidos se expresan como equivalentes de Trolox, el cual es calculado a partir de la pendiente de la gráfica de área bajo la curva neta de cada antioxidante ($AUC_{\text{antioxidante}} - AUC_{\text{blanco}}$) versus concentración, en comparación con la pendiente de Trolox (**Ecuación 6**). Para realizar esta metodología se empleó un fluorímetro con lector de microplacas Synergy HT, de Biotek Instruments. Todos los resultados fueron realizados en triplicado y el valor de equivalentes de Trolox se expresó como el promedio \pm desviación estándar. El procedimiento se ha adaptado al descrito por Olea et al. [79].

$$\text{Índice ORAC} = \frac{(AUC_{\text{Antioxidante}} - AUC_{\text{blanco}})}{(AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blanco}})} \times \frac{[\text{Trolox}]}{[\text{Antioxidante}]} \quad (\text{Ecuación 6})$$

La fluoresceína presenta le ventaja de poseer un alto rendimiento cuántico a pH > 7 ($\Phi_F = 0,93$ [80]), no es costoso, es fotoestable y no presenta interacciones con compuestos frecuentemente empleados en la metodología .



Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-oico



Dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)

Figura 6 Estructuras químicas de Trolox y AAPH (o ABAP).

Pese a que este ensayo se ha empleado ampliamente para la evaluación de la actividad antioxidante de numerosos compuestos naturales y de origen sintético, E. Lissi y C. López [38] en el último tiempo han determinado que en las condiciones en que se realiza este ensayo se evalúa la capacidad antioxidante frente al radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), pero además se genera otro radical de mayor reactividad, el radical alcoxilo ($\text{RO}\cdot$). De este modo indican que la oxidación de la fluoresceína, que al encontrarse en baja concentración (70 nM), ocurre por acción de los radicales alcoxilos principalmente; y además, que en algunos compuestos que presentan bajos índices ORAC y ausencia de tiempos de inducción, sería el producto de la alta reactividad del radical alcoxilo que provocaría el rápido consumo del polifenol y por lo tanto, una rápida oxidación de la fluoresceína. De este modo, la contribución relativa de estos dos radicales en el proceso depende de la reactividad de la sonda

fluorescente y del antioxidante. Compuestos con baja reactividad, como el ácido cafeico y ferúlico, dan índices ORAC mayores que compuestos más reactivos frente a los radicales peroxilos a velocidades en el orden de los límites difusionales. También concluyeron que la fracción de radicales alcoxilos generada es menor en relación con la de los radicales peroxilos.

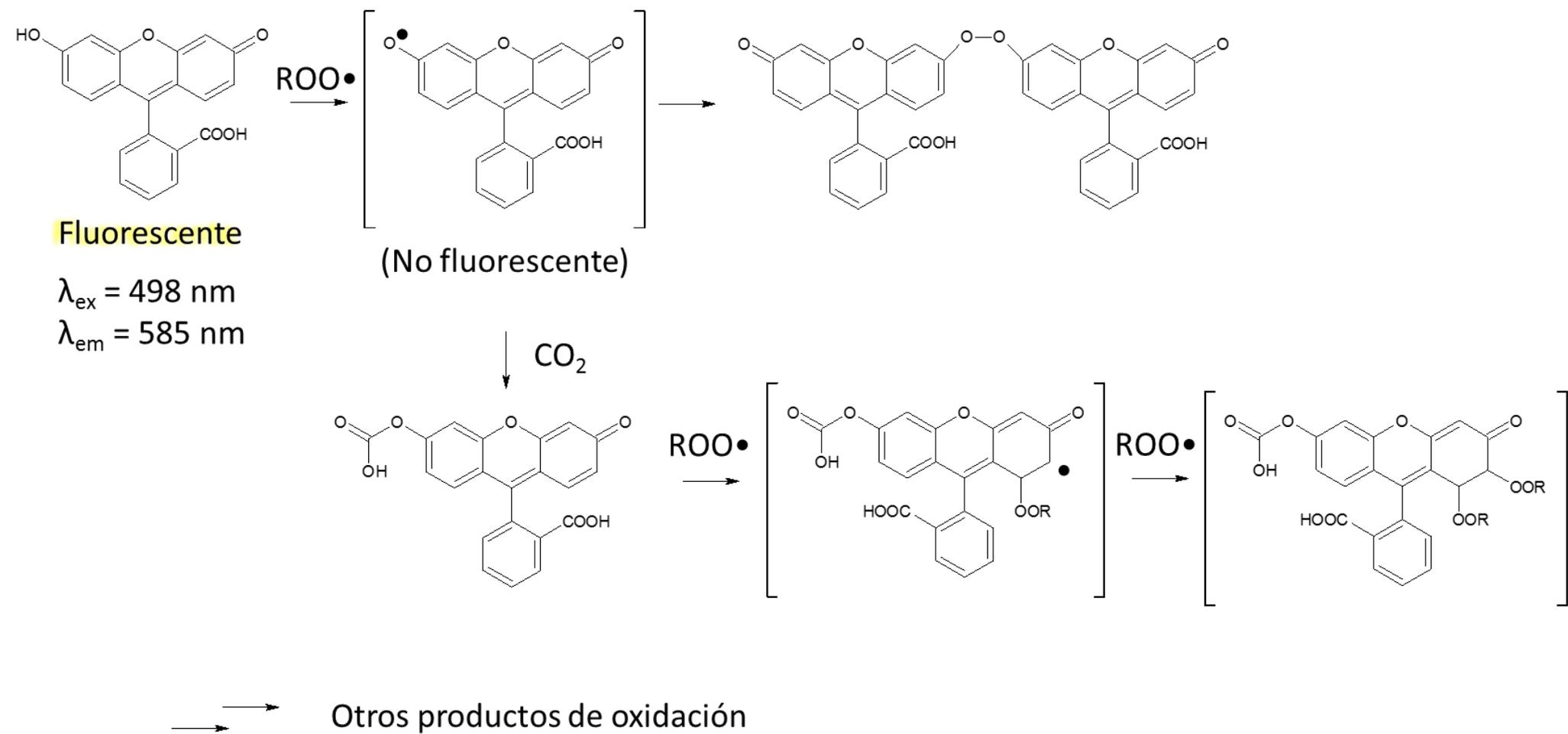


Figura 7. Productos de la oxidación de la fluoresceína por acción de los radicales peróxilos

En este ensayo se prepara una solución stock de fluoresceína (Sigma-Aldrich) en metanol de grado analítico a una concentración de 4,5 mM, posteriormente se diluye dos veces en tampón fosfato a pH 7,4 para obtener una concentración de 72 nM (el porcentaje de metanol es 0,16% del volumen total). La solución de AAPH (Sigma-Aldrich) es preparada en tampón fosfato a una concentración de 150 mM. Las soluciones stock de antioxidantes son preparados en metanol y posteriormente diluidos en tampón fosfato para obtener un rango de concentraciones entre 0,5 y 4 μ M en celda. Las soluciones se colocan en una placa blanca de poliestireno de 96 pocillos de la marca Nunc (Roskilde, Denmark) con volúmenes de 150 μ L de fluoresceína (concentración en celda de 54 nM), 25 μ L de antioxidante y 25 μ L de AAPH (concentración en celda de 18,75 mM). La placa es calentada a 37 °C en un fluorímetro con lector de placas Synergy™ HT de Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, VT, USA).

5.4 Ensayo ORAC-EPR.

El ensayo ORAC-EPR se basa en la reacción competitiva entre el *spin-trapping* de los radicales derivados de AAPH y su eliminación por antioxidantes. La fotólisis del AAPH 10 mM en tampón fosfato sódico a pH 7,4 en un medio aeróbico genera una serie de radicales, donde el principal radical es el alcoxilo (RO•) (**Figura 8**). El aducto DMPO-OR (constantes experimentales, $a_N = 14,55$ G, $a_H = 14,81$ G; según referencia: $a_N = 14,47$ G, $a_H = 14,84$ G [18]).

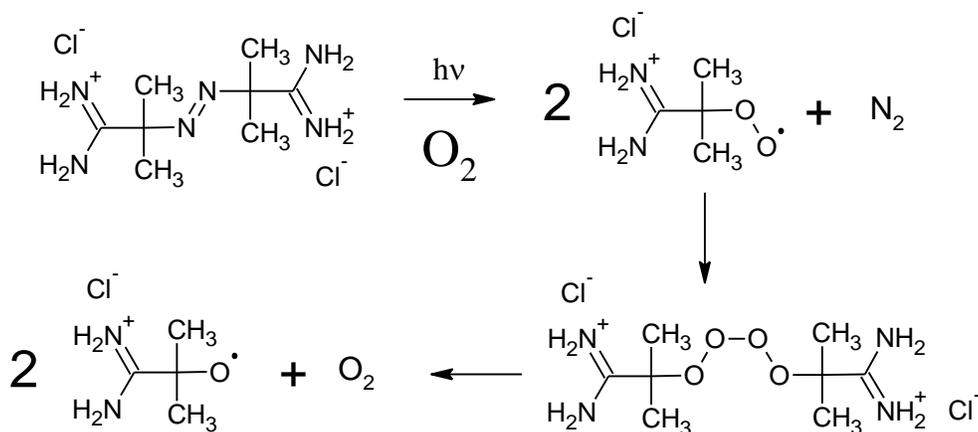
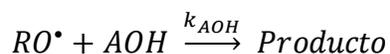
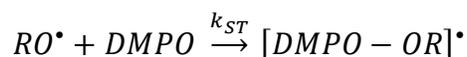


Figura 8 Mecanismo de generación de los radicales alcoxilos provenientes de la fotólisis de AAPH en medio acuoso aeróbico.

El AAPH es preparado a una concentración de 14 mM en tampón pH 7,4 (100 μ L), el DMPO se prepara en una concentración de 200 mM en tampón (50 μ L) y las concentraciones de AHC son preparadas a 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 mM en tampón (a partir de un stock de 10 mM en dimetilsulfóxido) (50 μ L). La solución es irradiada con una lámpara de deuterio (Ocean Optics DH-2000) por 5 min en una cubeta de cuarzo e inmediatamente se realiza la medición.

La determinación de los valores de ORAC se obtiene por comparación con un antioxidante patrón (Trolox) y un atrapador de espín (DMPO). En la reacción total, DMPO compite por el atrapamiento de los radicales alcoxilos ($RO\cdot$), con una constante cinética k_{ST} ; frente al *scavenging* de estos radicales por acción de los antioxidantes estudiados (AOH), cuya constante cinética es k_{AOH} .



Siendo I_0 la integración de la señal en ausencia de antioxidante e I la integración de la misma señal en presencia de antioxidante. Entonces $I_0 - I$ es proporcional a la velocidad de reacción en presencia del antioxidante, mientras que

I es proporcional a la reacción en ausencia de antioxidante, de esta forma se puede expresar la relación:

$$\frac{I_0 - I}{I} = \frac{k_{AOH}}{k_{ST}} \times \frac{[RO^\bullet][AOH]}{[RO^\bullet][DMPO]} = \frac{k_{AOH}}{k_{ST}} \times \frac{[AOH]}{[DMPO]}$$

El consumo de antioxidante y atrapador se pueden aproximar a las concentraciones iniciales $[AOH]_0$ y $[DMPO]_0$, respectivamente (**Ecuación 12**):

$$\frac{I_0}{I} - 1 = \frac{k_{AOH}}{k_{ST}} \times \frac{[AOH]_0}{[DMPO]_0} \quad \text{(Ecuación 12)}$$

Ya que la constante cinética de la reacción entre el atrapador y el radical alcoxilo, k_{ST} , es común entre todos los compuestos, se obtiene un índice ORAC-EPR comparando las pendientes (k_{AOH}/k_{ST}) del patrón Trolox con cada compuesto estudiado.

5.5 Ensayo de citotoxicidad en células de endotelio vascular humano (línea EA.hy 926) y células leucémicas humanas (línea HL-60), mediante la metodología de reducción del MTT.

El ensayo de citotoxicidad se realiza a través de la metodología de reducción de la sal de MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), según se ha descrito previamente [39] (**Figura 9**). Este ensayo no distingue entre células que se dividen activamente o que están quiescentes [81], por esta razón se ocupa como un ensayo preliminar para detectar las moléculas con mayor efecto antiproliferativo, el cual permite la detección de las células metabólicamente activas con respecto al control de solvente. Para este ensayo se incubó 5×10^5 células/mL de EA.hy 926 con diferentes concentraciones del compuesto prueba (1, 10 y 100 μM en el pocillo, disueltos en un pequeño volumen de dimetilsulfóxido, menor al 1% del volumen total) en medio de cultivo RPMI 1640 (suplementado con 5% de suero bovino fetal) con rojo fenol a 37°C en una placa de 96 pocillos de fondo plano,

durante 24 horas, posteriormente se lava dos veces con 200 μL de PBS, y se reemplaza por 100 μL de medio RPMI no suplementado y sin rojo fenol. Para los ensayos con las células leucémicas, de la línea HL-60, se incuban 5×10^5 células/mL en medio de cultivo IMDM sin rojo fenol y sin suplementar. Para ambos experimentos, el MTT se agrega a una concentración de 0,5 mg/mL con fenazina 5 mg/mL, incubándolo por 4 horas a 37°C y 5% de CO_2 , y luego se solubiliza con dodecil sulfato de sodio 10% con 0,1 mM de HCl por 24 h. La formación de formazán se mide a 570 nm utilizando un lector de multiplacas (Asys Expert Plus, Austria).

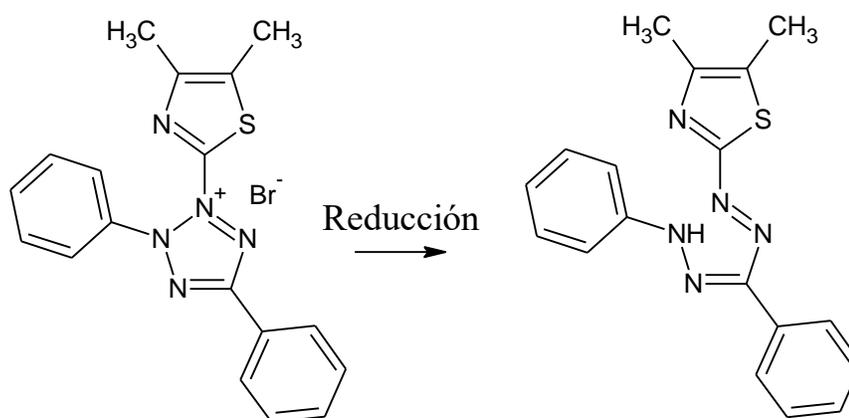


Figura 9 Reducción enzimática de la sal de (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (MTT).

El porcentaje de viabilidad se define como la disminución porcentual en la población en ausencia y presencia de compuesto incubado (**Ecuación 13**). Se obtiene mediante la absorbancia a 570 nm del MTT reducido (o formazán) en los pocillos con compuesto en comparación con aquellos pocillos en ausencia de compuesto (control).

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{D.O. \text{ compuesto}}{D.O. \text{ control}} \times 100 \quad \text{(Ecuación 13)}$$

El procedimiento habitual es realizar un *screening* de los compuestos empleando dos concentraciones (10 y 100 μM), en ambas líneas celulares.

Posteriormente se procede a calcular los IC_{50} del compuesto que se encuentre en este rango de concentraciones. El IC_{50} corresponde a la concentración que produce el 50% de la toxicidad máxima de un compuesto.

5.6 Coeficiente de reparto n-octanol/agua y de distribución n-octanol/tampón fosfato pH 7,4 y pH mediante HPLC.

Los tiempos de retención en RP-HPLC son determinados en un modo isocrático con un equipo Agilent modelo 1100, equipado con autosampler y detector DAD, utilizando una columna C-18 de Agilent Hypersil ODS (largo: 250 mm; diámetro interno: 4,6 mm; espesor fase estacionaria: 5 μ m); una fase móvil compuesta por acetonitrilo : agua : ácido ortofosfórico (39% : 61% : 0,092%) a un flujo de 0,7 min/mL. El sistema bifásico n-octanol/agua y n-octanol/tampón fosfato (0,1 M; pH 7,4) se dejan bajo agitación por 24 horas para lograr el equilibrio de reparto entre ambas fases. Posteriormente se incorporaba el compuesto disuelto en metanol de grado cromatográfico en una concentración conocida (10^{-5} M) dependiendo de la solubilidad del compuesto. Este sistema se dejaba en agitación por 24 horas más, y en seguida es medido en el equipo HPLC. Para la obtención del coeficiente de partición (P) (**Ecuación 14**), se integra el pico cromatográfico correspondiente a la fase n-octanol, previamente diluida en metanol (factor de dilución= 4) y luego el pico correspondiente al compuesto contenido en la fase acuosa. Lo mismo se realiza con el sistema n-octanol/tampón, obteniéndose el valor del coeficiente de distribución (D) (**Ecuación 15**). Los tiempos de retención (t_R) y los factores de capacidad (k') de cada compuesto se obtuvieron de un control de concentración conocida en agua destilada. El factor de capacidad, o factor de retención, que corresponde al tiempo de retención ajustado ($t_r - t_0$) dividido por el tiempo muerto (t_0) (**Ecuación 16**); cuyo valor da cuenta del grado de retención relativo de un compuesto con el del solvente no retenido en la columna. El tiempo

muerto fue obtenido a partir del pico que aparece al inicio de la medición, correspondiente a los solutos no retenidos y que no interactúan con la fase estacionaria, eluyéndose en la columna a la misma velocidad que la fase móvil.

$$P = \frac{[\text{Soluto}]_{n\text{-octanol}}}{[\text{Soluto}]_{\text{agua}}} \quad \text{(Ecuación 14)}$$

$$D = \frac{[\text{Soluto}]_{n\text{-octanol}}}{[\text{Soluto}]_{\text{tampón}}} \quad \text{(Ecuación 15)}$$

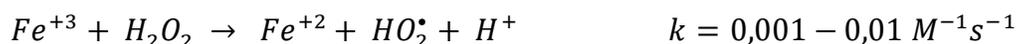
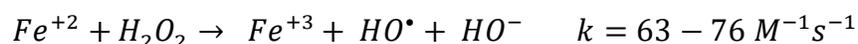
$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad \text{(Ecuación 16)}$$

Además, mediante la relación **(Ecuación 17)** [82] posible determinar el valor de pKa del grupo 4-OH, que es común para todos los compuestos en estudio, con los valores de coeficiente de partición (P), coeficiente de distribución (D) y pH del tampón.

$$pK_a = pH + \log\left(\frac{P}{D} - 1\right) \quad \text{(Ecuación 17)}$$

5.7 Reactividad frente al radical hidroxilo generado mediante la reacción de Fenton en medio homogéneo.

La clásica reacción de Fenton describe la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) catalizado por iones ferrosos (Fe^{+2}) con posterior generación de radicales hidroxilos mediante una serie de reacciones complejas [16, 17].



La generación del radical hidroxilo se monitoreó mediante la generación del aducto de espín DMPO-OH• ($k = 2,1-3,4 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ [83]), mientras que para el ácido caféico se ha determinado una constante cinética de *scavenging* del radical hidroxilo de $k = (3,24 \pm 0,12) \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ y para el ácido ferúlico (AC2) es $k = 4,6 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$. Con el propósito de determinar la reactividad entre el radical hidroxilo y los AHC, se preparan soluciones de AHC en una mezcla de tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,4 y un 1% de dimetilsulfóxido como co-solvente, las concentraciones en celda son de 0,1 y 1,0 mM, la concentración de DMPO en celda fue de 200 mM, preparado en tampón fosfato sódico 0,1 M y pH 7,4. La solución de hierro (II) se prepara a partir de una sal de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6 H_2O$ en agua nanopura con concentración en celda de 0,5 mM. El peróxido de hidrógeno se prepara al 10% v/v en tampón fosfato sódico. Cada medición se realiza por triplicado.

Además se realiza un ensayo en el cual la concentración de AHC (0,5 mM) es constante y concentraciones crecientes de hierro (II) de 0,5; 1,5; 2,0 y 4,5 mM. También las concentraciones de DMPO y peróxido de hidrógeno se mantienen constantes.

Con el propósito de evaluar el efecto reductor de los derivados de AHC frente al ion férrico se prepara una batería de soluciones de $FeCl_3$ en agua nanopura (resistividad 17,8 MΩ cm) con etanol absoluto (< 1% del volumen total de celda), en concentraciones de 0,5; 1,5; 2,0 y 4,5 mM en celda. Las concentraciones de DMPO y peróxido de hidrógeno se mantienen constantes.

Ensayos en medio microheterogéneo.

5.8 Preparación de liposomas y vesículas.

Los vesículas, sistema microheterogéneo formado por moléculas anfipáticas generalmente de forma esférica, cuyo diámetro está entre 20-500 nm, poseen una o más bicapas lipídicas (lamelas) que separan un compartimiento central acuoso del medio acuoso externo (medio dispersante) [31, 40, 84, 85]. Cuando la bicapa lipídica está formada por fosfolípidos se le nombra liposoma. En estos sistemas, compuestos hidrofílicos (en la cavidad central), hidrofóbicos (en la bicapa lipídica) y anfifílicos pueden ser incorporados en estos sistemas teniendo una amplia gama de aplicaciones en farmacéutica, química, alimentos, cosmética, entre otros. Los liposomas se pueden clasificar convencionalmente según su composición y tamaño [84, 86]; de acuerdo a esto se distinguen:

- I. Vesículas unilamelares pequeñas (SUV): 20-100 nm.
- II. Vesículas unilamelares grandes (LUV): > 100 nm.
- III. Vesículas unilamelares gigantes (GUV): > 1000 nm.
- IV. Vesículas oligolamelares (OLV): 100-500 nm.
- V. Vesículas multilamelares (MLV): > 500 nm.

Los ensayos en medio microheterogéneo son realizados con vesículas de cloruro de dioctadecildimetilamonio (DODAC), y liposomas de 1,2-dihexadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) y de 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) (**Figura 10**), con el propósito de realizar un análisis progresivo, se emplean vesículas de DODAC que poseen una interfase con carga formal positiva y dos colas hidrocarbonadas sin insaturación, posteriormente se emplean los liposomas de DPPC que poseen cabezas zwitteriónicas y cadenas alquílicas sin insaturaciones y finalmente liposomas formados de 70% DPPC y 30%

POPC, en los que se ha incorporado una insaturación en una de las cadenas alquílicas.

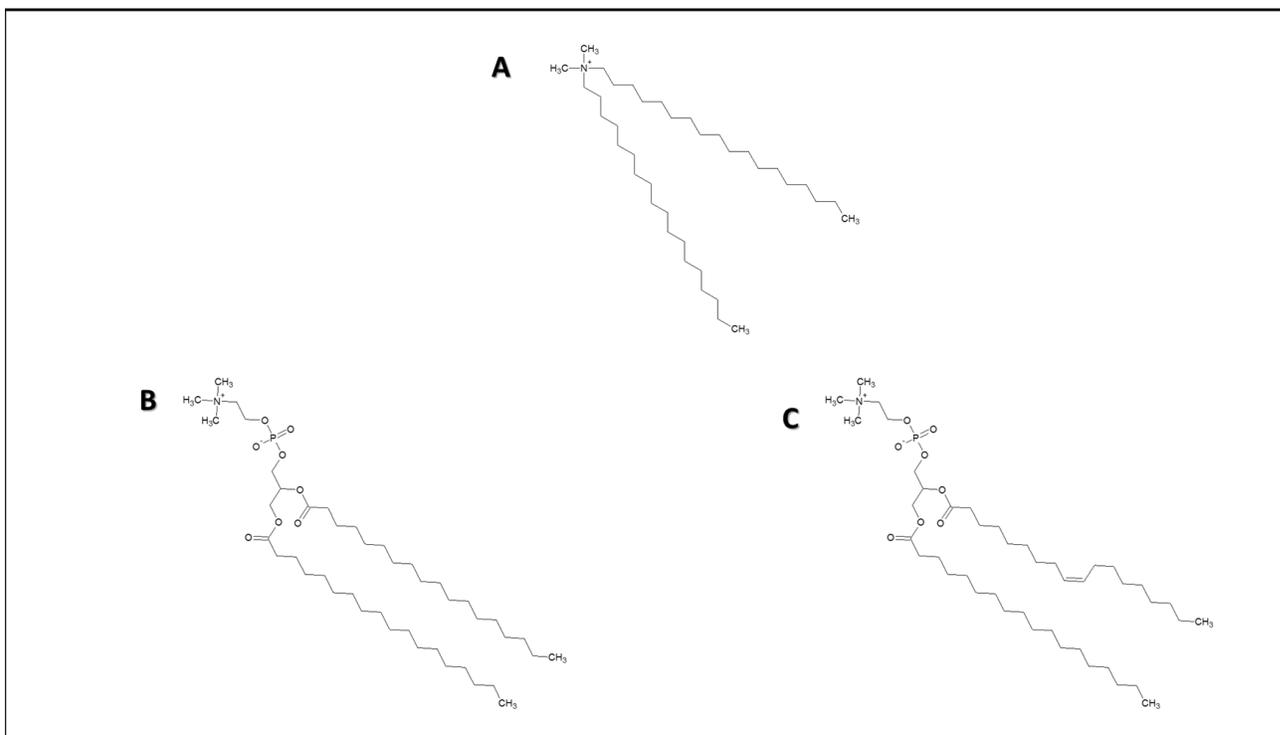


Figura 10 (A) DODAC, cloruro de dioctadecilamonio; (B) DPPC, 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina; (C) POPC, 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina.

Las vesículas de DODAC son suspendidas en agua nanopura a una concentración de 5 mM por sonicación.

Los liposomas de DPPC son preparados según la metodología descrita por Günther *et al.* [87], siendo disueltos en una pequeña cantidad de cloroformo. La solución se coloca en un tubo de ensayo, el solvente orgánico es evaporado mediante una corriente de nitrógeno, obteniéndose una película seca de lípidos. Los lípidos son hidratados añadiendo una cantidad adecuada de 100 mM de tampón fosfato de pH 7,4, a 60°C, asistido por agitación con agitador vórtex. La mezcla

tampón/fosfolípidos es calentada y agitada hasta la obtención de una suspensión lechosa homogénea. Esta suspensión es enfriada hasta congelación y luego calentada a 60 °C. La suspensión de MLVs es repetidamente extruida (10 veces) por un filtro de policarbonato de 400 nm y luego por uno de 200 nm empleando un extrusor Northern Lipid de capacidad para 10 mL.

Para los liposomas de DPPC:POPC (70:30) se prepara una solución de DPPC y POPC en una pequeña porción de cloroformo, empleando una relación en volumen de DPPC:POPC de 7:3. El procedimiento es el mismo que para la preparación de los liposomas de DPPC.

5.9 Reparto en medio homogéneo y vesículas de DODAC y liposomas de DPPC.

La determinación del reparto de un determinado compuesto en sistemas de membrana, como los liposomas, es más complejo debido a la existencia de diferentes zonas en la membrana; mientras que el reparto en un sistema octanol/agua es un proceso de reparto entre dos solventes. La anisotropía de la bicapa lipídica y su alta razón área/volumen convierte a este proceso de sorción más complejo. El reparto de especies cargadas en una membrana biológica es subestimado en las mediciones de reparto octanol/agua en comparación con los resultados obtenidos en un sistema membrana lipídica/agua [88, 89]. La sorción de especies cargadas en la superficie genera un potencial superficial en la bicapa lipídica que puede ser descrito por una combinación de la teoría de Gouy-Chapman de doble capa difusa de la interfase y por la teoría de adsorción de Langmuir [90]. El modelo descrito por Escher *et al.* [91] toma en consideración estas dos teorías. En la fase acuosa, el ácido orgánico se disocia según el equilibrio:



La expresión de la ley de masas para esta reacción es:

$$K_a^W = \frac{a_A^W a_H^W}{a_{HA}^W}$$

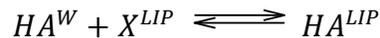
Donde K_a^W es comúnmente referida como la constante de acidez y a_A^W , a_H^W y a_{HA}^W representan las actividades de las especies A^- , el protón en la fase acuosa y HA , respectivamente. La actividad de una especie i se relaciona con la concentración a través del coeficiente de actividad γ_i^W ,

$$a_i^W = \gamma_i^W C_i^W$$

La concentración total del ácido y su base conjugada en la fase acuosa, C_{TOT}^W , está dado por:

$$C_{TOT}^W = C_{HA}^W + C_A^W$$

Tanto las especies HA^W y A^W se postula que interactúan con la membrana por medio de asociaciones con sitios de unión libres X^{LIP} de acuerdo con los equilibrios:



Donde HA^{LIP} y A^{LIP} hacen referencia a especies en la membrana. La ley de masas para estas reacciones es:

$$K_{HA} = \frac{a_{HA}^{LIP}}{a_{HA}^W \times C_X^{LIP}} e^{(-|z_{HA}|F\psi/RT)} \left[\frac{L_W}{mol} \right]$$

Donde K_{HA} es la constante de equilibrio de la sorción de la especie HA en la membrana. C_X^{LIP} es la concentración de sitios libres en la membrana. El término $\exp(-z_{HA}F\psi/RT)$ toma en cuenta la interacción electrostática de la especie cargada con la membrana cargada. La membrana de fosfatidilcolina es estequiométricamente zwitteriónica, es decir, no posee carga neta, pero se carga con la sorción de especies orgánicas cargadas. En el término electrostático, z_i

representa la carga de la molécula orgánica, F es la constante de Faraday, ψ es el potencial interfacial, R es la constante de los gases y T es la temperatura.

El reparto de una especie en un sistema liposoma-agua puede determinarse mediante metodologías analíticas que se basen en los cambios de una propiedad medible luego de la incorporación de la molécula en la membrana. Las espectrofotometrías UV-vis y de fluorescencia son especialmente útiles para este propósito. A pesar de su simplicidad, su aplicación se ve limitada en sistemas en que la dispersión de luz por señales de fondo es baja, como en soluciones micelares [92]. Cuando la aplicación directa de estas metodologías espectrofotométricas con gran cantidad de señal de fondo, causada por la presencia de liposomas [93-95] o células [96], el problema se puede minimizar mediante el uso de la espectrofotometría derivativa de primer o segundo orden (con respecto a la longitud de onda, λ).

En este trabajo se determina el reparto entre la fase acuosa y las vesículas y los liposomas conformados por especies anfipáticas DODAC y DPPC, según las metodologías de espectrofotometría UV-vis derivativa, de acuerdo a lo descrito por Rodrigues y *col.* [1]. Se evalúa el incremento de absorbancia derivada ($\Delta D = \left(\frac{dC_i}{d\lambda}\right) - \left(\frac{dC_{i-1}}{d\lambda}\right)$) al mantener constante la concentración de ácido hidroxicinámico (10 μM en celda) y concentraciones crecientes de liposomas (entre 0,25 y 250 μM en celda). Se determina el valor de las constantes de reparto K_p a partir de los espectros de absorción de la suspensión (**Ecuación 18**) [97, 98]. El rango de concentración en la que se cumple la ley de Beer es determinado para cada compuesto.

$$\frac{[L]}{\Delta D} = \left(\frac{1}{E C_T}\right) \times [L] + \frac{[W]}{K_p E C_T} \quad \text{(Ecuación 18)}$$

Donde [L] es la concentración de lípidos en mol L^{-1} , ΔD es la absorbancia derivativa, E es la derivada con respecto a la longitud de onda de la diferencia entre el coeficiente de extinción del analito en el lípido (ϵ_L) y en la fase acuosa (ϵ_W) ($E = \left(\frac{d\epsilon_L}{d\lambda}\right) - \left(\frac{d\epsilon_W}{d\lambda}\right)$), [W] es la concentración de agua (55 mol L^{-1}).

La metodología de espectrofotometría derivativa posee la ventaja de eliminar el efecto no deseado de línea base elevada (por inestabilidad de la lámpara o detector); permite que las bandas anchas se enangosten, aumentando la resolución de las señales; y permite suprimir el efecto de scattering provocado por un sistema microheterogéneo.

5.10 Reactividad frente al radical hidroxilo en medio homogéneo y en liposomas de DODAC, DPPC, DPPC/POPC y membranas de eritrocitos.

La reactividad entre los derivados de ácido hidroxicinámico seleccionados (AC1, AC3, AC5 y AC7) frente al radical hidroxilo se realiza mediante la cuantificación del consumo del ácido hidroxicinámico al reaccionar con el radical hidroxilo generado *in situ* de manera constante por fotólisis del peróxido de hidrógeno al 10%. La cuantificación de cada ácido hidroxicinámico se realiza mediante el desarrollo de una metodología RP-HPLC adecuada a diferentes tiempos de fotólisis con una lámpara UV. Se toman alícuotas a distintos tiempos de radiación de una solución compuesta por peróxido de hidrógeno al 10% en celda, agua nanopura y una solución concentrada del ácido hidroxicinámico en metanol (10 μ M) en una celda de cuarzo, en el caso del ensayo en medio homogéneo se miden directamente, para DODAC, DPPC/POPC y los fantasmas de eritrocitos se disuelven en una relación 1:1 (alícuota/etanol), para DPPC en 1:3 (alícuota/etanol), posteriormente son centrifugadas a 8000 rpm por 20 min y medidas por HPLC. Las constantes experimentales se determinan mediante el ajuste de pseudo-primer orden con respecto al consumo del respectivo ácido hidroxicinámico.

Los fantasmas son residuos post-hemolíticos de eritrocitos, correspondientes a eritrocitos a los cuales se les ha eliminado el contenido intracelular, por lo cual están formados mayormente de membranas celulares [99]. Por este motivo, los

fantasmas de eritrocitos son ampliamente empleados para los estudios de composición, estructura y funcionamiento de membranas de eritrocitos. La metodología más usada para la preparación de fantasmas es mediante la inducción de estrés mecánico provocado por diferencias de presión osmótica entre el medio externo y el medio intracelular [100]. Para este propósito, se emplea 10 mL de sangre de conejo obtenidas del Instituto de Salud Pública. A la muestra se le adiciona citrato sódico 3,8 g/100 mL de agua nanopura como agente anticoagulante. Posteriormente, la muestra se centrifuga por 10 minutos a 8000 rpm a una temperatura constante de 4°C, el pellet obtenido es dispersado en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 y sometiéndolo a las mismas condiciones de centrifugación, repitiendo este proceso de lavado dos veces más. Luego los eritrocitos limpios se redisuelven en 40 mL de tampón fosfato 1 mM a pH 7,4. Esta muestra es agitada en vórtex y centrifugada por 30 minutos a 8000 rpm a una temperatura constante de 4°C. Este proceso se repite hasta la obtención de un pellet de color blanco correspondiente a los eritrocitos hemolizados. Finalmente, las membranas obtenidas son resuspendidas en 50-100 mL de solución tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4. Se utiliza una lámpara UV (Blak-Ray, long wave UV modelo B 100 AP) que proporciona una potencia constante de 100 W. En este ensayo no se observa degradación de los AHC por fotólisis a 365 nm (longitud de onda de trabajo).

5.11 Anisotropía de fluorescencia.

Los ácidos fenólicos pueden interactuar con las bicapas lipídicas mediante (1) la adsorción en la interfase a través de interacciones entre las cabezas polares de los lípidos y los grupos hidrofílicos de los compuestos fenólicos, los cuales son también dependientes del pH del medio de dispersión; y mediante (2) la partición de los segmentos hidrofóbicos en la región apolar de la membrana. Estas interacciones que ocurren entre los ácidos fenólicos y las membranas pueden contribuir a la capacidad antioxidante, protegiendo la integridad de la bicapa lipídica frente a agentes nocivos [74].

Las sondas fluorescentes han sido ampliamente empleadas para estudiar la estructura de membranas biológicas y modelos de membranas [101]. Las sondas fluorescentes 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), sulfonato de 1-anilino-8-naftaleno (ANS) y 4-trimetilamonio-1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH) se prepararon en dimetilsulfóxido, en una concentración final de 1 μM (**Figura 11**). Los liposomas de DPPC/POPC (1 mM en tampón 0,1 M con pH ajustado en 7,4) se incuban con la sonda en un baño de agua a 40°C por 30 min.

Las muestras son irradiadas con luz monocromática (λ_{ex}) polarizada linealmente (horizontalmente-h o verticalmente-v) y se registró la intensidad de la fluorescencia emitida (I) paralela (I_{||}) o perpendicular (I_⊥) a la dirección del haz de excitación. Las mediciones se realizan a temperatura ambiente en un fluorímetro Agilent (modelo Cary Eclipse). Las longitudes de onda de excitación y emisión son: para DPH: $\lambda_{\text{ex}} = 357 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 435 \text{ nm}$; TMA-DPH: $\lambda_{\text{ex}} = 358 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 428 \text{ nm}$; ANS: $\lambda_{\text{ex}} = 337 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$.

La anisotropía de fluorescencia de una sonda (**Ecuación 19**) se define como:

$$r = \frac{I_{vv} - I_{vh} \times G}{I_{vv} + 2I_{vh} \times G} \quad \text{(Ecuación 19)}$$

Donde I_{VV} e I_{VH} son las intensidades de fluorescencia emitida cuando la dirección de la luz emitida es paralela y perpendicular, respectivamente, en relación a la luz de excitación polarizada verticalmente. G es un factor de corrección ($G=I_{HV}/I_{HH}$) del sistema óptico dado por la razón entre la intensidad de la luz emitida con componentes de polarización vertical y horizontal, con respecto a la luz de excitación con dirección de polarización horizontal. Los valores de anisotropía de fluorescencia son inversamente proporcional a la fluidez de la membrana. Un valor alto de anisotropía de fluorescencia representa un alto orden estructural o una baja fluidez de la membrana.

El DPH debido a su carácter altamente hidrofóbico debiese ubicarse preferentemente entre las cadenas lipídicas de las membranas, y la molécula se orientaría en el plano perpendicular al plano de la membrana (**Figura 11**). Sin embargo, algunos autores indican que el DPH podría posicionarse en dos regiones de la membrana distintas: en el interior de la membrana [102] cerca de las cadenas alquílicas, y por otro lado, la molécula sonda se ubicaría de manera paralela al plano de la membrana; la orientación que adquiriría la molécula sonda en el interior de la membrana se vería influenciada por la fase de la membrana.

Por otro lado, la sonda TMA-DPH se emplea para monitorear la fluidez cerca de la superficie de la membrana. La región polar de esta sonda se encontraría ubicada en la interfase agua/lípido (**Figura 11**), mientras que la región hidrocarbonada ingresa en la región lipídica de la membrana. El largo de la parte hidrofóbica del TMA-DPH es aproximadamente equivalente al largo de una cadena de 10 carbonos [103], entregando información del microambiente de la superficie y glicerol de la membrana plasmática [104]. ANS se une a los fosfolípidos de tal forma que el grupo sulfonato aniónico se orienta hacia las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos [105].

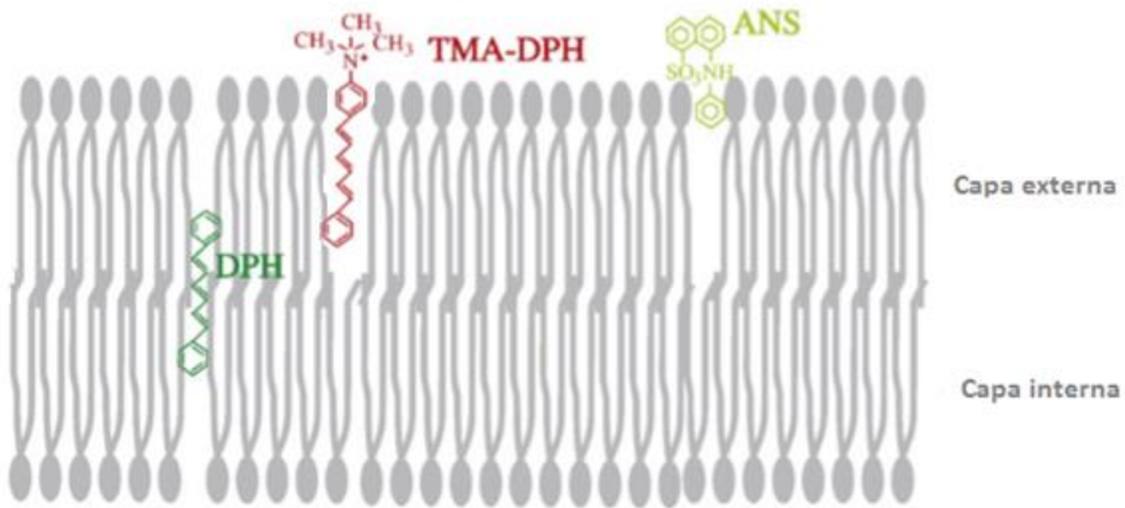


Figura 11 Adaptación de [101]. Localización de las sondas fluorescentes ANS, TMA-DPH y DPH en una bicapa lipídica.

5.12 Actividad antioxidante intracelular empleando menadiona mediante la metodología de *spin-trapping*

Con el propósito de evaluar la actividad antioxidante en células de epitelio vascular humano EA.hy926, en un capilar de 200 μL , abierto y silente al EPR, se incuban las células en una concentración de $1,4 \times 10^7$ células/mL con DMPO 200 mM (tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,4) el cual atraviesa rápidamente las membranas biológicas por difusión pasiva [73], bisulfito menadiona sódico a una concentración en celda de 25 μM (preparada en tampón fosfato y 1% de dimetilsulfóxido), que genera estrés oxidativo intracelular (**Figura 12**), NADPH 6,66 mg/mL (tampón fosfato 0,1 M). Los derivados de AHC se prepararan a una concentración en celda de 10 μM (preparado en tampón fosfato sódico y un 1% de dimetilsulfóxido). Luego de cinco minutos de incubación son medidas, realizando diez barridos para cada muestra. Para realizar este ensayo se seleccionaron cinco

de los compuestos (AC1, AC3, AC5, AC7 y AC13) de la serie, a partir de los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad

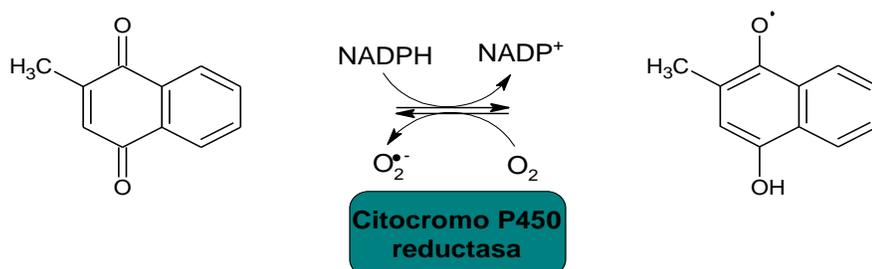


Figura 12 La menadiona (2-metilnaftalen-1,4-diona) o vitamina K3, entra en un ciclaje redox por acción del NADPH-citocromo P450 reductasa. En este proceso, la menadiona sufre una reducción monoeléctrica formando la especie radicalaria semiquinona que reacciona con el oxígeno para regenerar la menadiona, generándose la especie superóxido [80].

5.13 Actividad antioxidante intracelular empleando la sonda pro-fluorescente diacetato de diclorodihidrofluoresceína.

Con el propósito de determinar la actividad antioxidante en el interior de las células de epitelio vascular humano EA.hy 926 se emplea la sonda no fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA) que posee la característica de ser permeable a la membrana celular y ser sensible en la detección de especies reactivas de oxígeno intracelulares (**Figura 13**) [81, 106-108]. Se conoce que esta sonda lipofílica puede fácilmente atravesar la membrana por difusión pasiva y sufrir deacetilación por acción de esterasas intracelulares, generando la sonda no fluorescente que es sensible a oxidantes 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂), la cual no difunde al exterior de la célula. En presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y otras ROS y RNS (como los radicales

peroxilos, hidroxilos y óxido nitroso, además del anión peroxinitrito) [107], así como por enzimas con grupos heme como peroxidasas o el citocromo c, la DCFH₂ es oxidada a diclorofluoresceína (DCF) que es altamente fluorescente (**Figura 14**). La intensidad de fluorescencia de la DCF puede ser fácilmente medida y es la base para la detección de ROS intracelulares en este ensayo. De donde se obtiene un porcentaje de disminución de la fluorescencia a causa de la incubación con un antioxidante (**Ecuación 19**) con respecto a un control (con presencia de AAPH y ausencia de antioxidante), donde además se descuenta la fluorescencia producida por las células en ausencia de AAPH (blanco).

$$AAC = \left\{ \left(\frac{F_{AH} - F_{CONTROL}}{F_{CONTROL}} \right) - \frac{F_{BLANCO}}{F_{CONTROL}} \right\} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 19})$$

La metodología empleada se basa en la descrita por Saleta Vasquez y col. [109]. Brevemente, las células EA.hy 926 son sembradas a una densidad de 50.000 células/pocillo en un medio de cultivo RPMI1640. Después de 24 h se remueve el medio de cultivo y se lava con PBS. Los pocillos son tratados con 20 µM de la sonda DCFH₂-DA en RPMI1640 libre de SBF y se agregan los compuestos en dos concentraciones diferentes 1 y 10 µM finales. Luego de transcurrido una hora de incubación los pocillos son lavados con PBS. Luego se agrega AAPH con una concentración final de 600 µM. El AAPH, el cual genera radicales peroxilos por termólisis, oxida la sonda DCFH₂ a la sonda fluorescente DCF *in vitro* [110]. Los radicales peroxilos comienzan la peroxidación lipídica mediante reacciones en cadena radicalarias en la bicapa lipídica, produciendo peroxilos lipídicos [111], los cuales oxidan a la sonda DCFH₂ a la sonda fluorescente DCF [112]. Finalmente, se mide la placa en un fluorímetro con multilector de placas a λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 538 nm.

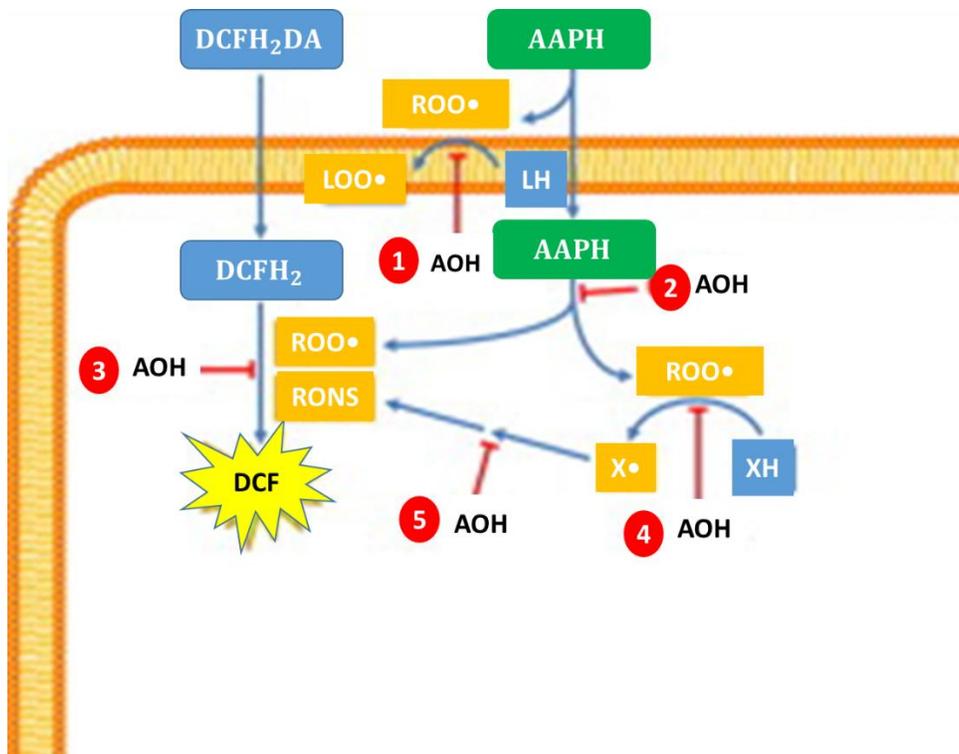


Figura 13 Representación esquemática del ensayo de actividad antioxidante celular. Las células son incubadas con la sonda DCFH₂ (la forma ester DCFH₂ de modo que atraviese la membrana y en interior de la célula sea hidrolizada por esterasas endógenas). Las células son incubadas con los polifenoles de estudio (AOH) y expuestas a AAPH que genera un flujo de radicales peroxilos. Los AOH pueden proteger a DCFH₂ de la oxidación (disminución de fluorescencia) por diferentes mecanismos: (1) Scavenging de los radicales peroxilos en la membrana disminuyendo la lipoperoxidación, (2) reaccionando con el AAPH evitando la formación de peroxilos intracelulares, (3) compitiendo con la DCFH₂ por los oxidantes ROS/RNS, (4) reaccionando con los radicales peroxilos previniendo la formación de otros radicales, (5) inhibiendo las vías redox hacia la formación de ROS/RNS que oxidan DCFH₂. Adaptación de [81].

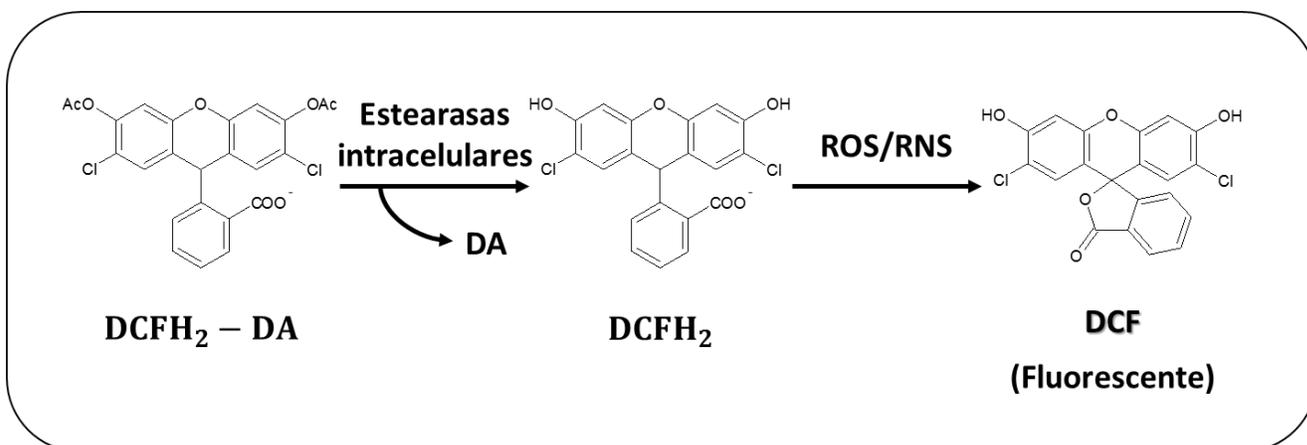


Figura 14 Secuencia de deacetilación de la diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA) en el interior de la célula para formar diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂) que posteriormente es oxidada por ROS/RNS a diclorofluoresceína (DCF) la cual es seguida por fluorescencia.

5.14. Determinación de la estequiometría y constante de equilibrio de complejación por el método de las variaciones continuas.

El método de variaciones continuas permite determinar la fórmula del complejo formado y su constante de estabilidad [113, 114], para ello se mide la absorbancia del complejo para diferentes valores relativos de concentración de ligando/metál. Las medidas se llevan a cabo a una longitud de onda donde el complejo sea la única especie responsable de la absorción. Este método es sólo aplicable a complejos mononucleares. La formación del complejo puede escribirse como:



Donde M es el ion metálico, L es el ligando. Para el método de las variaciones continuas se prepara una serie de soluciones en las que la concentración total de ligando (C_L) más metal (C_M) se mantiene constante:

$$C_T = C_M + C_L = \text{constante}$$

Mientras se varía la relación de uno con respecto del otro. Dicho de otro modo, se varía la fracción molar del metal ($f_M = C_M/C_T$) tomando valores entre 0 y 1. De este modo se obtiene una curva del tipo parábola invertida, donde el máximo corresponde a la fracción molar del metal dada por la estequiometría del complejo (ML_n). En ese punto la concentración del metal será:

$$C_M^{m\acute{a}x} = f_M \times C_T$$

Y la del ligando:

$$C_L^{m\acute{a}x} = (1 - f_M) \times C_T$$

Por lo tanto, el número de ligandos que forman el complejo monodentado:

$$n = \frac{C_L^{m\acute{a}x}}{C_M^{m\acute{a}x}} = \frac{(1 - f_M)}{f_M}$$

Conociendo la estequiometría exacta del complejo es posible calcular la concentración molar del metal en la intersección de las rectas de extrapolación de las pendientes ascendentes y descendentes de la parábola invertida que corresponde a la concentración molar total del complejo en el caso hipotético de que todo el metal se encontrase complejado. Con esta concentración y la absorbancia en el vértice del triángulo es posible calcular el coeficiente de absorción molar del complejo:

$$A_{ext} = \epsilon_c b C_{ML_n} = \epsilon_c b \frac{C_T}{(n + 1)}$$

Obteniendo ϵ_c se determinan las concentraciones reales de todas las especies en cada punto. La concentración del complejo será:

$$[ML_n]_i = \frac{A_i}{\epsilon_c b} = \frac{A_i C_T}{A_{ext} (n + 1)}$$

Sabiendo la concentración analítica total del metal y ligando en cada punto:

$$[M] = C_M - [ML_n] = f_M C_T - \frac{A_i C_T}{A_{ext}(n+1)}$$

$$[L] = C_L - n[ML_n] = (1 - f_M) C_T - \frac{A_i C_T}{A_{ext}(n+1)}$$

La constante global de formación del complejo se obtiene reemplazando las concentraciones:

$$K_f = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n}$$

6. Resultados y discusión.

6.1. Estudio electroquímico.

Muchos antioxidantes han demostrado sufrir mecanismos de transferencia electrónica cuando ejercen su función antioxidante. Como consecuencia, la electroquímica se ha empleado para evaluar la actividad antioxidante, ya que proporciona información directa y detallada de la oxidación de estos compuestos. Correlaciones cuantitativas se han establecido entre la actividad antioxidante y los potenciales redox, sugiriendo que este parámetro fisicoquímico podría ser considerado como una buena medida de la actividad antioxidante [115].

De este modo, se realizó el estudio de las propiedades electroquímicas de los compuestos derivados de AHC. Así, las propiedades redox fueron estudiadas a pH fisiológico 7,4 por medio de las metodologías de voltamperometría cíclica (VC) y de pulso diferencial (VPD), empleando el electrodo de trabajo de carbón vítreo.

En general para los derivados catecólicos (AC1, AC5, AC13), los voltamperogramas cíclicos exhibieron un solo pico de oxidación y uno de reducción en el barrido de vuelta (**Figura 15-A**), con una diferencia de potenciales de pico mayor que 40 mV (considerando una transferencia de 2 electrones en el par redox) a un barrido de potencial de $2,0 \text{ V s}^{-1}$, y un pico único en el voltamograma de pulso diferencial (**Figura 15-B**); además, la diferencia de potencial aumenta con los incrementos en la velocidad de barrido y el potencial de pico se desplaza con la velocidad de barrido, lo que indica que el proceso de transferencia electrónica cuasirreversible. El parámetro $i_{pa}v^{1/2}$ disminuye con la velocidad de barrido tendiendo a un valor constante, indicando que la transferencia electrónica es irreversible y está acoplada a una reacción química irreversible (**Figura 15-D**); así también, la razón de corriente i_{pa}/i_{pc} es mayor a 1 y aumenta con la velocidad de barrido (**Figura 16-A**), evidenciando un mecanismo del tipo E_iC_i. Además, a partir

del gráfico E_{pa} con el logaritmo de la velocidad de barrido es lineal y la pendiente es 16 mV (**Figura 16-B**), que es indicador de una segunda etapa de transferencia electrónica, por lo que el mecanismo sería del tipo ECE [116, 117], Hotta *et al.* indican que además podría tener lugar un mecanismo ECEC [36], vale decir, que tanto la *o*-semiquinona como la *o*-quinona podrían pasar por etapas químicas irreversibles (**Figura 17**), ya sea dismutación, dimerización o ciclación. El gráfico de potencial de pico ($\log I_p$) en función de la velocidad de barrido ($\log v$), obtenido por VC, presentó una correlación lineal (**Figura 16-C**); indicando que el proceso de transferencia electrónica está controlado por la difusión del compuesto desde el seno de la solución a la superficie del electrodo. Estos resultados son concordantes con los descritos en literatura [36] y son extensibles a los demás compuestos catecólicos (AC5 y AC13) que presentaron el mismo comportamiento electroquímico.

Los voltamperogramas de pulso diferencial de los compuestos dihidroxilados del ácido cinámico (AC1, AC5 y AC13), presentan un único pico de oxidación bien definido. Los picos de oxidación de estos compuestos están relacionados con la oxidación del grupo catecol generando el derivado *o*-quinona respectivo.

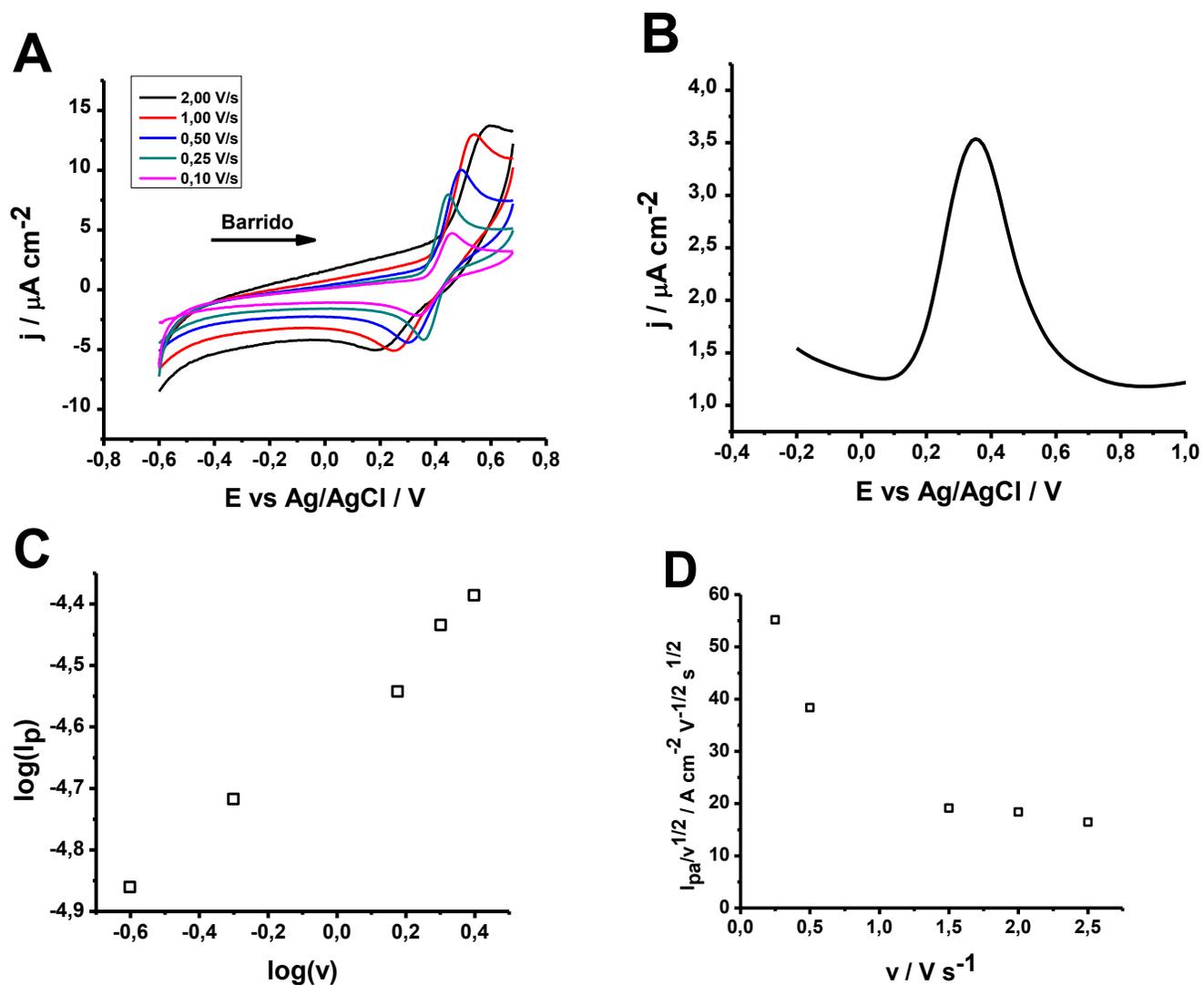


Figura 15 (A) Voltamperogramas cíclicos de AC1 a distintas velocidades de barrido. (B) Voltamograma de pulso diferencial de AC1 a 20 mV/s. (C) Gráfico del logaritmo de la corriente de pico anódico versus el logaritmo de la velocidad de barrido en VC. (D) Gráfico de la función de corriente ($I_{pa}v^{1/2}$) versus la velocidad de barrido en VC.

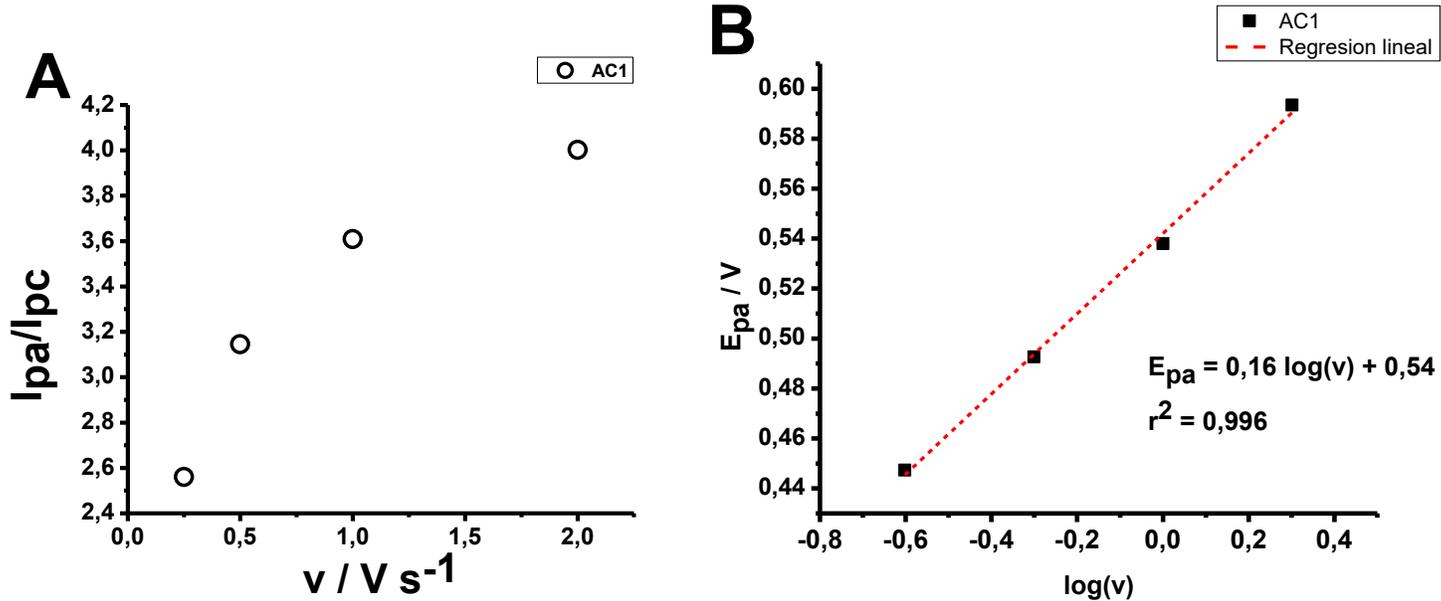


Figura 16 (A) Gráfico razón de corrientes I_{pa}/I_{pc} versus la velocidad de barrido en V/s para el compuesto AC1. (B) Variación del potencial de pico anódico E_{pa} con el logaritmo de la velocidad de barrido.

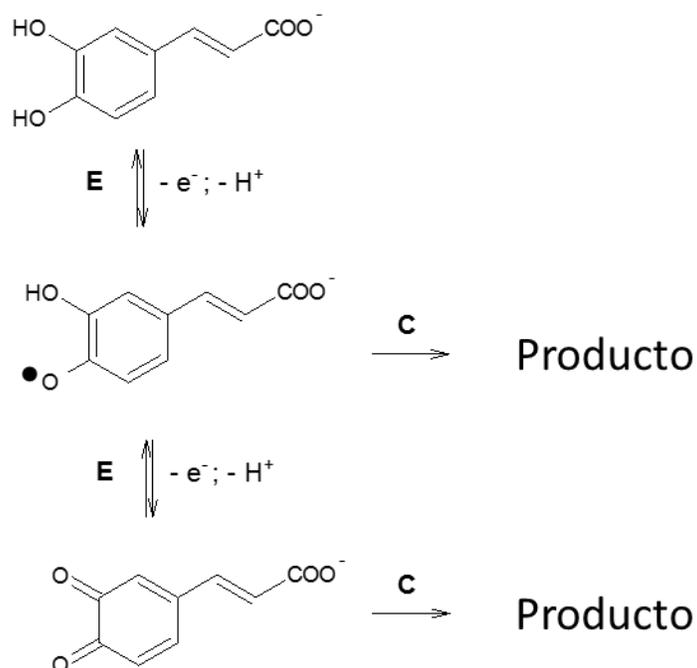


Figura 17 Reacción de oxidación del ácido caféico en medio prótico descrita por un mecanismo ECEC [36].

El estudio de VPD del ácido ferúlico (AC2) y sus derivados (AC4, AC6-AC12) presentan dos picos de oxidación convolucionados a pH 7,4 (**Figura 18**). Los potenciales de oxidación de AC2, $E_p=423$ mV y $E_p'=460$ mV, están relacionadas con la oxidación del grupo fenólico presente en la estructura [37]. Estos resultados se han interpretado como la transferencia electrónica del AHC tanto en su forma libre como adsorbida, donde la especie fuertemente adsorbida se observa como un prepico [40]. Para confirmar esto, se realizaron barridos sucesivos sobre el electrodo de carbón vítreo sin pulir la superficie entre barridos, produciendo la separación de los picos en el segundo barrido acompañado de la disminución en la intensidad de las señales, en el tercer barrido se conserva el potencial de oxidación de las señales obtenidas durante el segundo barrido pero la primera señal aumenta en intensidad y la segunda disminuye, corroborando que la primera señal corresponde a la reacción electroquímica del compuesto adsorbido en la superficie mientras que la segunda señal es la del compuesto en solución. Este fenómeno fue también observado al emplear un electrodo de trabajo de plata (**Figura 19**). Por este motivo

para el análisis de los potenciales de oxidación se empleó el correspondiente a la segunda señal. Este hecho es producto de la formación de productos poliméricos en la superficie del electrodo [37] de los productos de oxidación de los ácidos ferúlicos (**Figura 20**).

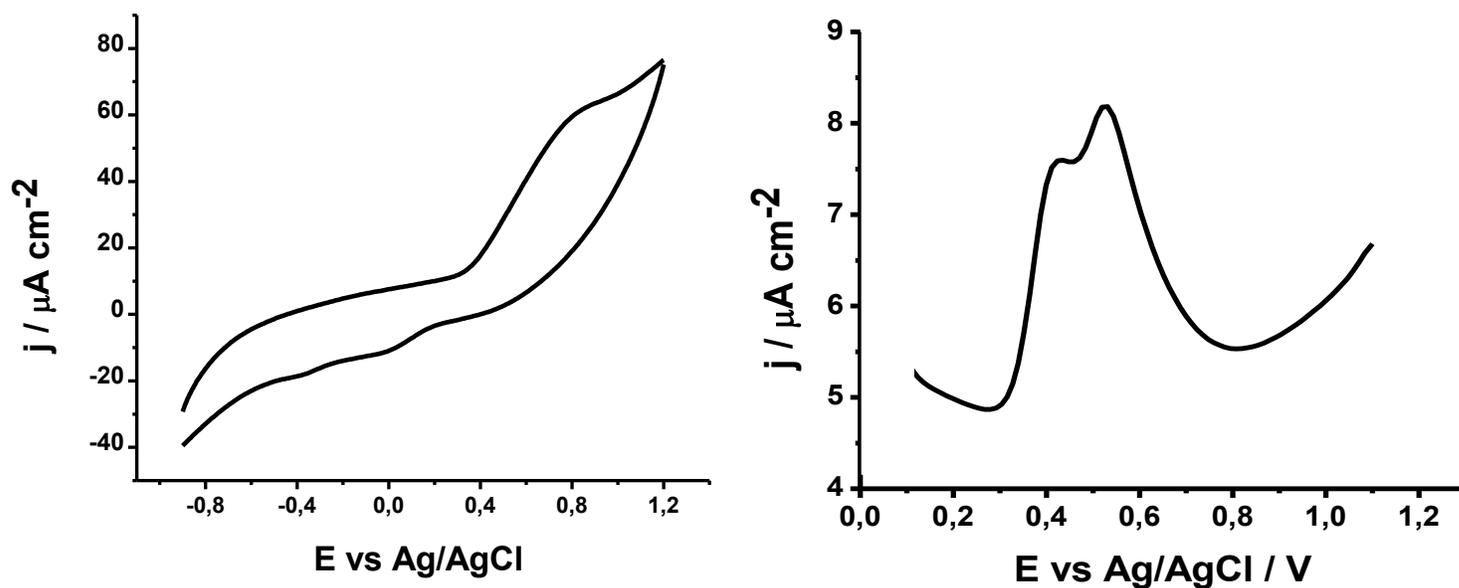


Figura 18 Voltamperograma cíclico del ácido ferúlico (AC2) y voltamperograma de pulso diferencial.

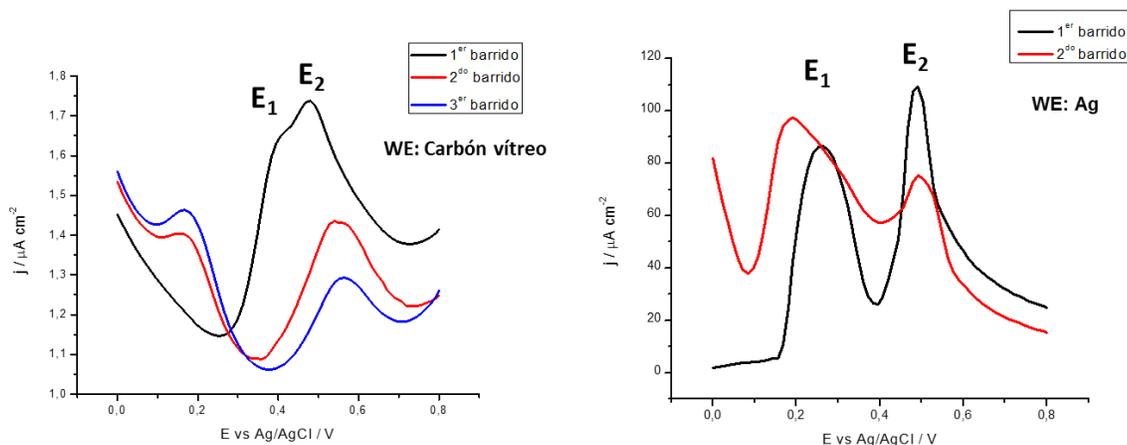
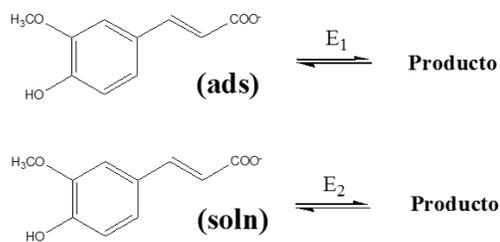


Figura 19 Voltamperogramas de pulso diferencial del ácido ferúlico (AC2) (abajo, izquierda) empleando un electrodo de trabajo de carbón vítreo, y realizando tres ciclos sin pulir la superficie del electrodo entre cada ciclo; (abajo, derecha) y un electrodo de plata realizando dos ciclos sucesivos. E_1 corresponde al potencial de oxidación de la especie adsorbida en la superficie del electrodo de trabajo y E_2 al de la especie en solución.

Por otro lado, el estudio de VC arrojó voltamperogramas con picos de intensidad débil, por lo que los análisis electroquímicos se realizaron con los datos obtenidos mediante la técnica de VPD.

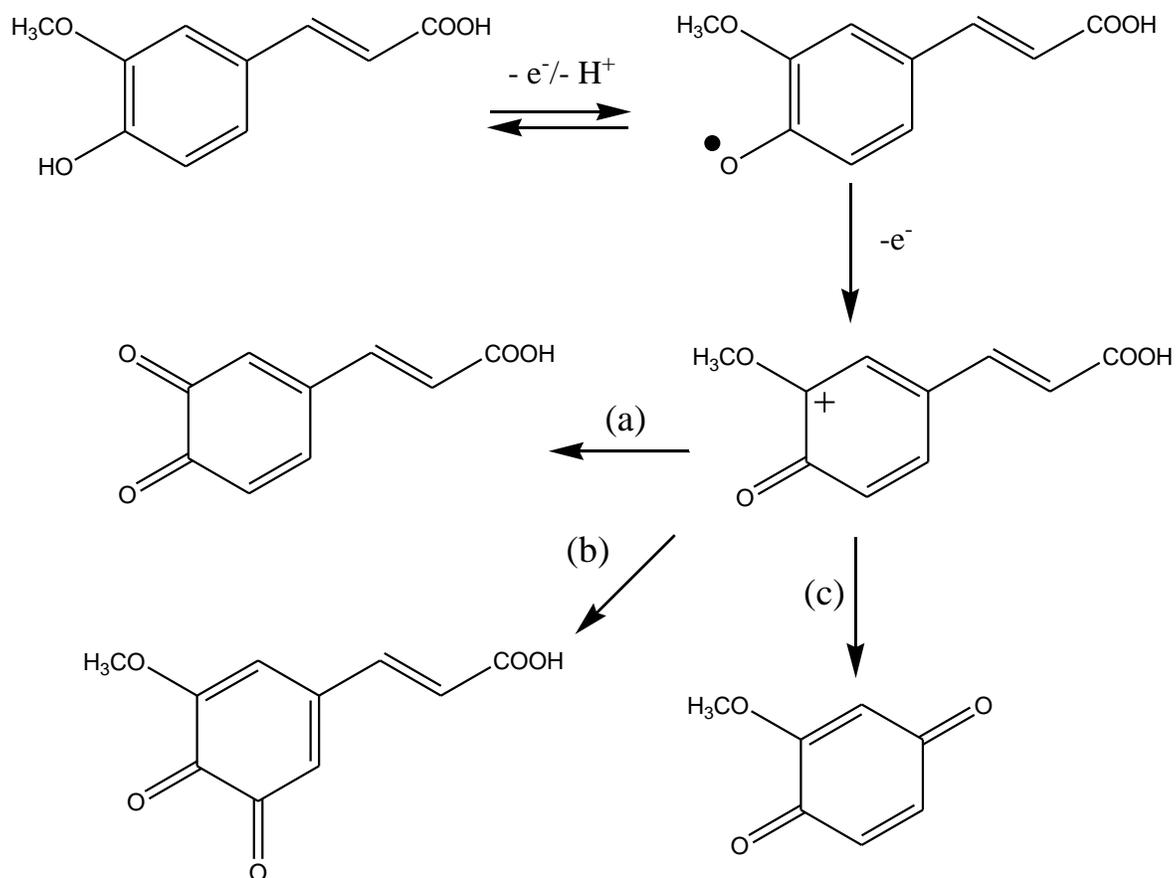


Figura 20 Mecanismos de oxidación de ácido ferúlico [37]. (a) + H_2O ; $-H^+$, $-CH_3OH$; (b) + H_2O ; $-H^+$; (c) + H_2O ; $-H^+$, $-CH_2=CH-CO_2H$.

El compuesto AC3 (**Figura 21,22**) presenta un pico anódico intenso a $E_{pa} = 103$ mV, y dos picos débiles a potenciales más anódicos. Y en VC exhibió una señal de oxidación muy débil $\sim 0,6$ V.

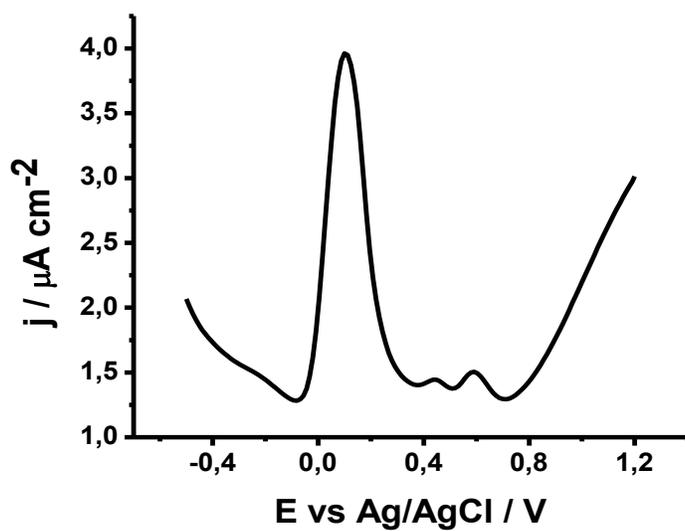
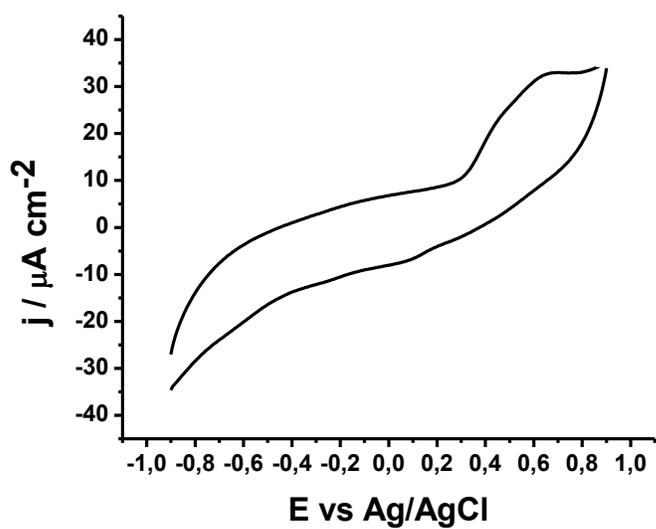


Figura 21 Voltamperograma cíclico y de pulso diferencial de AC3.

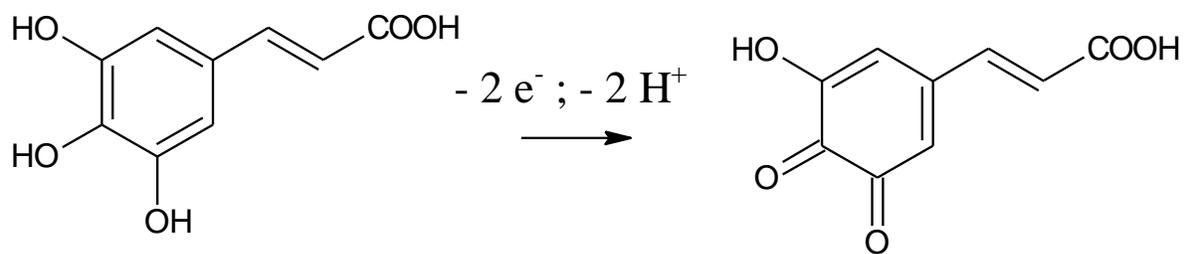


Figura 22 Reacción de oxidación de AC3.

Tabla IV. Potenciales de oxidación de los compuestos en medio mixto tampón (0,1 M; pH 7,4):metanol (70:30), mediante VPD. Velocidad de barrido: 20 mV/s. Los potenciales empleados para los análisis posteriores se indican mediante el subrayado.

Compuesto	Potencial de oxidación / mV
AC1	196
AC2	423; <u>460</u>
AC3	<u>103</u> ; 447; 588
AC4	319; <u>439</u>
AC5	280
AC6	280; <u>382</u>
AC7	280; <u>387</u>
AC8	280; <u>388</u>
AC9	238; <u>415</u>
AC10	268; <u>376</u>
AC11	304; <u>448</u>
AC12	213; <u>230</u>
AC13	288

Los resultados muestran que mientras mayor es el número de grupos hidroxilos en el anillo aromático, menor es el potencial de oxidación del compuesto (**Tabla IV**). El potencial del derivado trihidroxilado (AC3) es menor que el de los derivados dihidroxilados (AC1, AC5 y AC13). En ambos casos la presencia de un sustituyente hidroxilo vecino al centro de reacción favorece termodinámicamente el proceso de oxidación debido a la capacidad electrodonora del grupo hidroxilo, y la estabilidad del producto *o*-quinona formado; sin embargo, la presencia del grupo nitro, por ser fuertemente atractor de la densidad electrónica de la molécula,

aumenta el potencial de oxidación en comparación con los otros dos compuestos dihidroxilados.

La metoxilación del grupo vecinal al hidroxilo de los derivados cinámicos (AC4, AC6-AC12) desplaza el potencial de pico anódico a valores más positivos, haciéndolos menos favorables de oxidar. La incorporación de un sustituyente fenilo en posición 5 aumenta el potencial de oxidación del ácido cafeico (E_{pa} AC1 = 196 mV; E_{pa} AC5 = 280 mV), mientras que la disminuye en el caso del ácido ferúlico (E_{pa} AC2 = 460 mV; E_{pa} AC6 = 382 mV). En este caso el sustituyente fenilo ejerce un efecto diferente sobre el centro de reacción debido a que los mecanismos de oxidación son diferentes, ya que en AC5 existen dos grupos con efecto electroattractor (3-OH y 5-Ph), en AC6 se encuentra un electrodonor y un electroattractor mesomérico (3-OCH₃ y 5-Ph, respectivamente).

Los compuestos con los potenciales de oxidación mayores, en la serie de compuestos de derivados del ácido 5-fenilferúlico, poseen grupos electrodoadores en posición *para* (AC7-8) excepto los compuestos AC6 y AC12 que poseen sustituyentes 5-fenil y 5-(4'-metil)fenil, respectivamente, cuyo disminución en el potencial de oxidación es mayor. Además, los compuestos con grupos electroattractores; esto es, AC9-11, también disminuyen el potencial de oxidación, pero en menor grado que los compuestos con sustituyentes electrodoadores. En otras palabras, el sustituyente 5-fenil se puede considerar como un grupo que disminuye el potencial de oxidación del ácido ferúlico; y que el grado con el que se desplaza el potencial de oxidación depende de las propiedades electrónicas de los sustituyentes en el anillo aromático.

Al graficar el potencial de oxidación frente al pKa (**Anexo 1**), se observa una tendencia lineal creciente (**Figura 23**) entre estos parámetros fisicoquímicos, donde aquellos compuestos con menor pKa tienden a disminuir el potencial de oxidación. Sin embargo, aquellos compuestos en que el grado de ionización es mayor al 8% se observó una desviación de esta tendencia, donde su potencial de oxidación es mayor al esperado por la tendencia. Estos compuestos son AC4, AC11 y AC13, los

cuales poseen grupos electroattractores que pudieran aumentar el potencial de oxidación de los aniones.

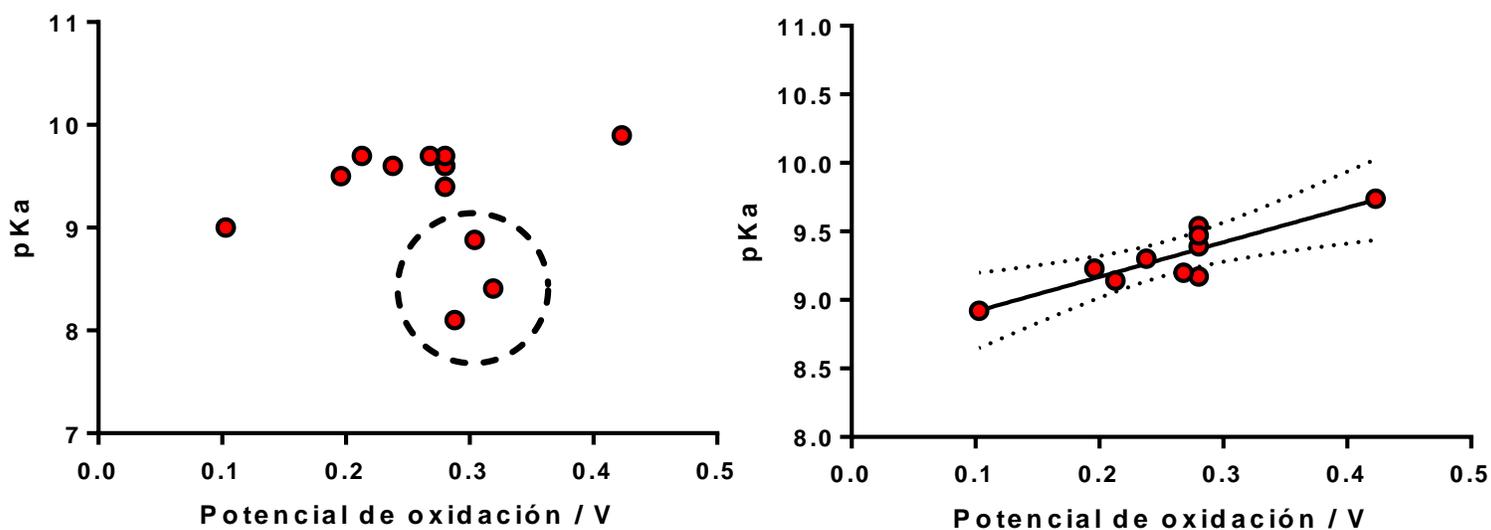


Figura 23 (Izquierda) pK_a frente al potencial de oxidación (vs Ag/AgCl) en volts para los 13 compuestos, los compuestos AC4, AC11 y AC13 se indican encerradas en el círculo. (Derecha) Regresión lineal de los compuestos sin considerar AC4, AC11 y AC13. Ecuación de la regresión: $Y = 2,53 \cdot X + 8,66$; $r^2 = 0,777$; $n = 10$; $S_{y,x} = 0,117$.

6.2 Caracterización mediante EPR de los radicales derivados de AHC generados electroquímicamente.

6.2.1 Generación en medio aprótico polar (DMSO).

El método desarrollado permite monitorear el proceso de oxidación y caracterización del radical formado *in situ* empleando las condiciones experimentales que se utilizaron en los ensayos electroquímicos previamente descritos. En este sistema se empleó DMSO como solvente y electrolito de soporte la sal de TBAP. Para poder identificar la presencia y generación de una especie radicalaria durante la oxidación electródica, se puede estabilizar el radical libre mediante la quelación con metales; sin embargo, muchos complejos de polifenoles con iones de metales de transición reducen al ion metálico luego de ser quelados y posteriormente re-oxidados en presencia de oxígeno.

Por este motivo se formaron complejos de zinc, los cuales no son sensibles a la oxidación por parte de los polifenoles, esto es debido a que el ion Zn^{+2} posee una configuración electrónica d^{10} que le confiere inactividad en reacciones de óxido-reducción en un amplio rango de potenciales. Luego de la oxidación del ligando, que conduce a la reorganización electrónica del polifenol, el Zn^{+2} es capaz de detener este proceso permitiendo que la *o*-semiquinona originada a partir del catecol que se ha oxidado sea estable en presencia de Zn^{+2} (también con Cd^{+2} y Mg^{+2}) [118], lo cual facilita el estudio EPR de radicales libres transientes de polifenoles que involucren una etapa de oxidación monoelectrónica [119-121].

De este modo, los radicales de los compuestos que poseen anillos 3,4-dihidroxilados y 3,4,5-trihidroxilados son difícilmente detectables mediante esta metodología a causa de su rápido decaimiento, se empleó cloruro de zinc ($ZnCl_2$) que permite aumentar la vida media del radical generado mediante la complejación del Zn^{+2} con los radicales fenólicos, debido a que la formación del complejo radical catecólico- Zn^{+2} es más estable que la estabilización del radical catecólico por formación de puente de hidrógeno intramolecular, permitiendo ser utilizados como

modelo para la determinación de los patrones de acoplamiento hiperfino de los radicales derivados de AHC con grupos catecólicos. Esto permitiría evidenciar que la oxidación de estos compuestos en este medio transcurriría mediante la formación de un intermediario radicalario.

Se observó que tanto los radicales de AC1 y AC3 presentan patrones de acoplamiento complejos (**Figura 24**), producto de una alta deslocalización de la densidad de espín en la molécula. En el caso del compuesto AC5, se distingue una disminución en el número de líneas como consecuencia de la sustitución de un átomo de hidrógeno en la posición 5 por un anillo bencénico que no contribuye significativamente a la deslocalización. En el caso de AC13, se observa una disminución en el número de líneas en comparación con AC1, debido a que la mayor densidad de espín se encuentra en las cercanías del grupo nitro, que se ve reflejado en el alto valor de la constante de acoplamiento (**Tabla V**) para los hidrógenos en el anillo aromático.

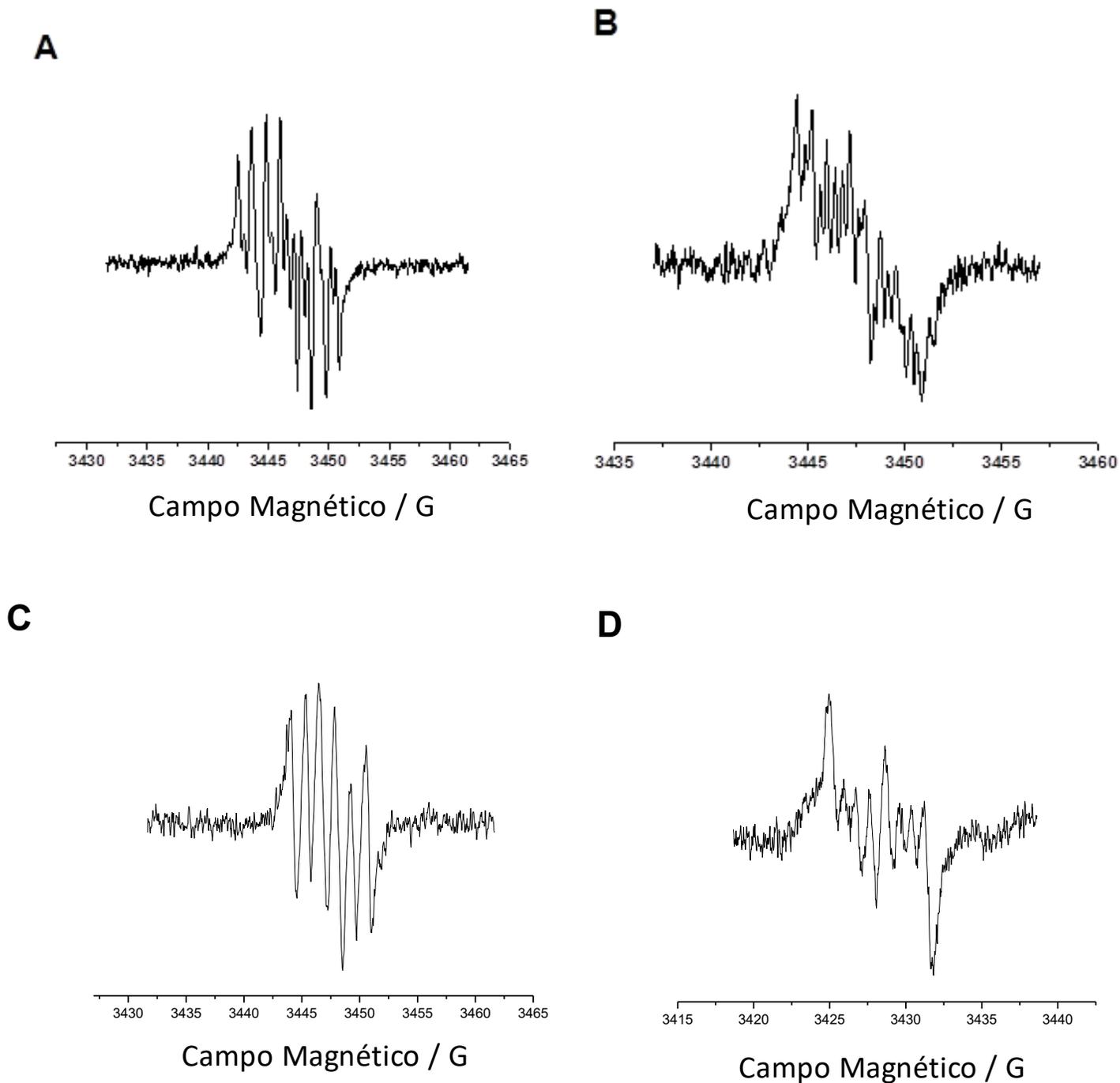


Figura 24 (A) Espectro de AC1-Zn²⁺; (B) Espectro de AC3-Zn²⁺; (C) Espectro de AC5-Zn²⁺; (D) Espectro de AC13-Zn²⁺. Todos estos espectros fueron realizados en las mismas condiciones experimentales.

Tabla V. Constantes de acoplamiento hiperfino experimentales. La numeración corresponde a hidrógenos diferentes en la molécula y no se corresponde con la numeración IUPAC del anillo de ácido cinámico.

Compuesto	Constantes de acoplamiento hiperfino / G				
	a _{H1}	a _{H2}	a _{H3}	a _{H4}	a _{H5}
AC1	3,02	2,36	1,24	1,03	0,43
AC3	2,45	1,66	1,32	0,94	2,45
AC5	2,75	1,56	0,83	0,70	0,39
AC13	3,62	1,69	0,87	0,30	-

Para el caso de los compuestos que son derivados del ácido ferúlico y sus derivados, que presentan mayor impedimento para la formación de un complejo con el Zn⁺², se empleó PBN como atrapador de espín para la detección de radicales formados durante el proceso de oxidación. Ya que el PBN se oxida a altos potenciales, sus productos de oxidación no son observables en las condiciones experimentales. Un patrón característico de triplete de dobletes se observa en este espectro (a_N = 14,7 G y a_H = 2,35 G) (**Figura 25**) indicando que el aducto radicalario formado durante la reacción es entre el PBN y un radical centrado en carbono de los derivados de AHC (**Figura 26**).

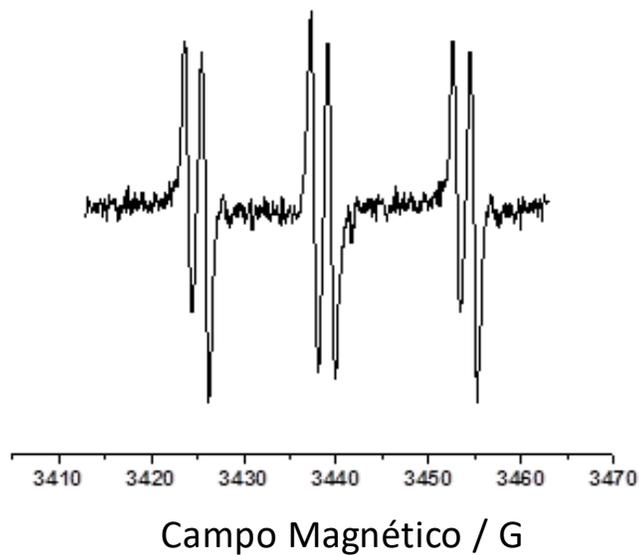


Figura 25 Aducto radicalario entre el ácido ferúlico y PBN en DMSO ($a_N = 14,7\text{G}$; $a_H = 2,35\text{G}$).

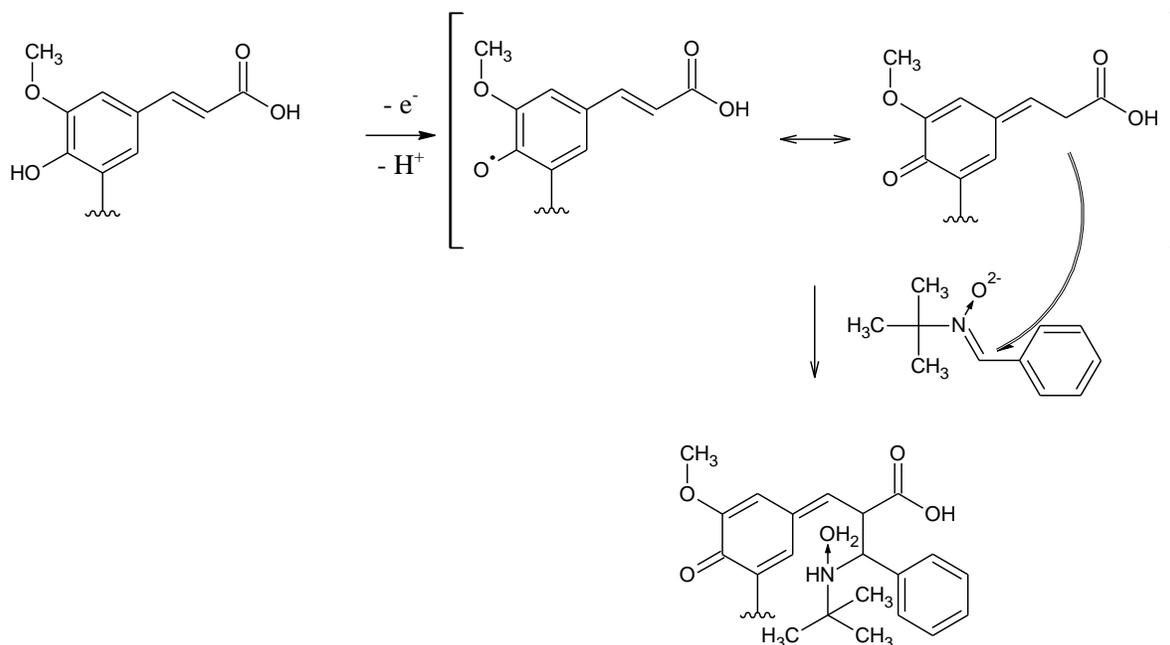


Figura 26 Posible mecanismo del aducto radicalario formado entre los derivados de ácido ferúlico y el atrapador de spin PBN en DMSO.

6.2.2. Generación en medio acuoso.

En los sistemas que contienen el anillo catecólico y galolil, se realizó la medición en presencia y en ausencia de cloruro de zinc, detectando señales de muy baja intensidad. Por este motivo, este ensayo se repitió utilizando un atrapador de espín POBN, el análogo hidrosoluble de PBN, no pudiendo detectar la formación de un aducto radicalario. Esto puede ser explicado por la corta vida media de los radicales libres intermediarios en este medio y por la rápida generación *in situ* del producto de oxidación más estable no radicalario que puede ocurrir la oxidación vía dos electrones.

6.3 ORAC-FL

La capacidad de *scavenging* del radical peroxilo/alcoxilo de los compuestos derivados de ácido hidroxicinámico fueron evaluados mediante la metodología de ORAC-FL. En este ensayo se obtiene un índice antioxidante relativo a Trolox, que se utiliza como compuesto patrón, un derivado hidrosoluble de la vitamina E. La exposición de un compuesto fluorescente (fluoresceína, FL) a radicales peroxilos conduce a la oxidación de este compuesto, proceso que se evidencia en el decaimiento en la emisión de fluorescencia a través del tiempo (**Figura 27, 28**), evento que se relacionaría con la estequiometría de la reacción entre los radicales peroxilos y el antioxidante. Los compuestos AHC presentaron perfiles similares de decaimiento de la intensidad de fluorescencia en el tiempo (**Figura 27**) con un notorio tiempo de inducción dependiente de la concentración de AHC empleado.

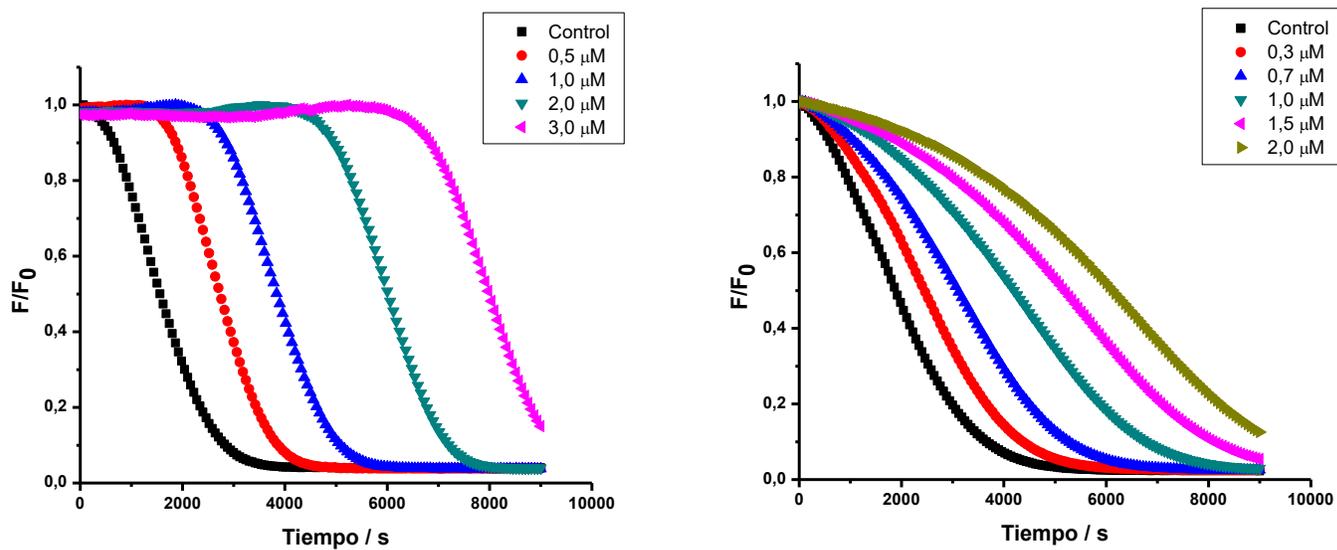


Figura 27 Perfil de decaimiento de la fluoorecencia normalizada a 528 nm en el tiempo del compuesto AC1 (izquierda) y AC3 (derecha).

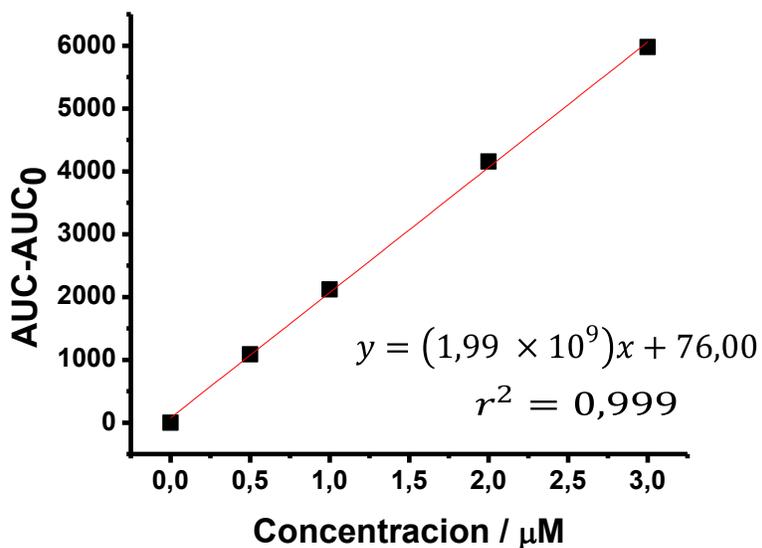


Figura 28 Gráfico de la relación entre la concentración de AC1 y el área bajo la curva neta (AUC-AUC₀), correspondiente al área bajo la curva del decaimiento de fluoorecencia a concentraciones crecientes de AHC (AUC) con respecto al control (AUC₀) en ausencia de AHC. La pendiente de este gráfico se compara con la respuesta de Trolox según la ecuación 6.

Tabla VI. Valores de índice ORAC de cada compuesto, incluido el patrón Trolox, de acuerdo a la ecuación 6.

Compuesto	Índice ORAC-FL
AC1	4,3 ± 0,3
AC2	3,1 ± 0,2
AC3	1,4 ± 0,0
AC4	2,1 ± 0,1
AC5	4,0 ± 0,1
AC6	3,0 ± 0,2
AC7	2,9 ± 0,2
AC8	1,8 ± 0,1
AC9	2,1 ± 0,2
AC10	3,1 ± 0,2
AC11	2,1 ± 0,1
AC12	2,3 ± 0,2
AC13	1,8 ± 0,1
Trolox	1,0

Los ácidos cafeico (AC1) y 5-fenilcafeico (AC5) ($4,3 \pm 0,3$ y $4,0 \pm 0,1$, respectivamente), así como los ácidos ferúlico (AC2) y 5-fenilferúlico (AC6) ($3,1 \pm 0,2$ y $3,0 \pm 0,2$, respectivamente) presentan la mayor actividad antioxidante de esta serie; siendo comparables con los valores reportados en literatura para los ácidos cafeico y ferúlico [87, 102]. Esta mayor actividad se ha justificado por medio del efecto resonante donador del grupo vecino hidroxilo al centro de reacción y por la estabilización que confiere en el radical fenoxilo la formación de un puente de hidrógeno con el grupo vecinal hidroxilo. La sustitución en AC1 por un anillo

bencénico en posición 5 (AC5), no modifica significativamente la actividad de este compuesto; debido a que el efecto electrónico que confiere el sustituyente se ve mermado por no encontrarse coplanar al anillo catecólico del ácido cafeico.

La sustitución del grupo 3-hidroxilo por metoxilo, en el caso del ácido ferúlico (AC2), disminuye la capacidad antioxidante ($3,1 \pm 0,2$), explicado por la menor capacidad electrodonora del grupo metoxilo en comparación con el grupo hidroxilo; y además por la imposibilidad de generar un puente de hidrógeno intramolecular que estabilice al radical fenoxilo producido en la reacción. Una mayor disminución en la capacidad antioxidante se observa cuando se sustituye un átomo de bromo en posición *orto* al grupo hidroxilo (AC4), ejerciendo principalmente un efecto electrónico inductivo atractor, el cual disminuye la labilidad del enlace O-H. Si en esta misma posición se sustituye por un anillo bencénico (AC6), no se observa un cambio significativo en la capacidad antioxidante ($3,0 \pm 0,2$) en comparación con AC2 que no posee el anillo bencénico (AC2); este mismo efecto se observó al comparar AC1 y AC5, anteriormente.

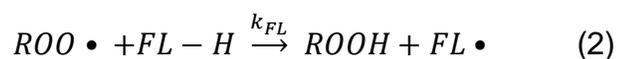
A partir de AC6, las sustituciones en posición 4' del anillo 4-fenil, ejercen un efecto distinto dependiendo de sus características electrónicas. Un sustituyente 4'-fluoro no afecta significativamente la capacidad antioxidante ($3,1 \pm 0,2$), debido al débil efecto resonante donador y su lejanía del centro de reacción para ejercer su efecto inductivo atractor. Los grupos 4'-OCH₃, 4'-Cl, 4'-NO₂ y 4'-CH₃ no presentan diferencias significativas de capacidad antioxidantes entre sí ($\sim 2,1$); sin embargo, disminuyen la capacidad antioxidante del ácido 4-fenilferúlico (AC6). Estos sustituyentes que poseen propiedades electrónicas diferentes y generan un efecto neto similar en la capacidad antioxidante de la molécula, podría deberse al impedimento estérico del anillo bencénico sustituido, dificultando así el acercamiento del radical peroxilo al centro de reacción.

Por otro lado, en el compuesto 3',4'-diOCH₃ (AC7), se evidencia que la presencia de un segundo grupo metoxilo en comparación con el compuesto AC8, provoca una disminución menor de la capacidad antioxidante con respecto a AC6. Posiblemente debido al efecto aditivo de dos sustituyentes electrodonores sobre el

centro de reacción. Este efecto fue explicado por *Todorova y col.* [122] que sostiene que sustituyentes electrodonores (M+) en posición 4 disminuyen el ángulo diedro entre dos anillos aromáticos, permitiendo de este modo una mayor deslocalización de los electrones entre los dos anillos aromáticos, siendo este efecto más pronunciado con la presencia de un segundo sustituyente electrodonor en posición 3.

La incorporación de otro grupo hidroxilo en posición 5 del anillo (AC3), conduce a la disminución en la capacidad antioxidante (índice ORAC-FL: $1,4 \pm 0,0$), en comparación con el análogo dihidroxilado (AC1) (**Figura 27**). Este fenómeno se produciría por la menor disponibilidad de átomos de hidrógeno transferibles debido a la presencia de dos puentes de hidrógeno intramolecular sobre el mismo centro de reacción (grupo 4-OH). Cuando en esta posición se sustituye por un átomo de bromo (AC4), también se produce una disminución en la capacidad antioxidante ($2,1 \pm 0,1$). La sustitución por el grupo nitro (AC13), que es fuertemente electroattractor, produce una pronunciada disminución de la actividad con respecto al patrón AC1.

Es interesante notar que de acuerdo el mecanismo de protección de la sonda FL frente a la oxidación de los radicales provenientes de la termólisis del AAPH:



En cuyo modelo simple de oxidación competitiva de la sonda FL y el antioxidante AH por los radicales ROO• se toma en consideración las ecuaciones (1)-(4) y las reacciones entre radicales iguales y con otros radicales que tienen lugar entre las reacciones 2-3. En este esquema simplificado tampoco se considera la

formación de **radicales alcoxilos** en la reacción 4. Este esquema predice el incremento monótono de la razón R_0/R (donde R_0 es la velocidad inicial de consumo de fluoresceína en ausencia de antioxidante, mientras que R es la velocidad inicial de consumo en presencia de antioxidante) con el aumento de la concentración de antioxidante **(Ecuación 20)**.

$$\frac{R_0}{R} = 1 + \frac{k_{AH}}{k_{FL}} \times \frac{[AH]}{[FL]} \quad \text{(Ecuación 20)}$$

Se aprecia que aquellos compuestos con menor reactividad presentan mayores índices ORAC-FL (AC1 y AC5) y muestran prolongados tiempos de inducción dependientes de la concentración de AHC **(Figura 27)**, mientras que aquellos compuestos más reactivos (AC3 y AC13) poseen los menores índices ORAC-FL, encontrándose en la parte inferior de la recta **(Figura 29)**. Este comportamiento más reactivo frente a los radicales presentes en el sistema da cuenta de un consumo superior de estos compuestos, generando poca protección de la sonda y por lo tanto, bajos índices ORAC-FL. Además estos compuestos no presentaron tiempos de inducción en sus perfiles de decaimiento de fluoresceína **(Figura 27)**.

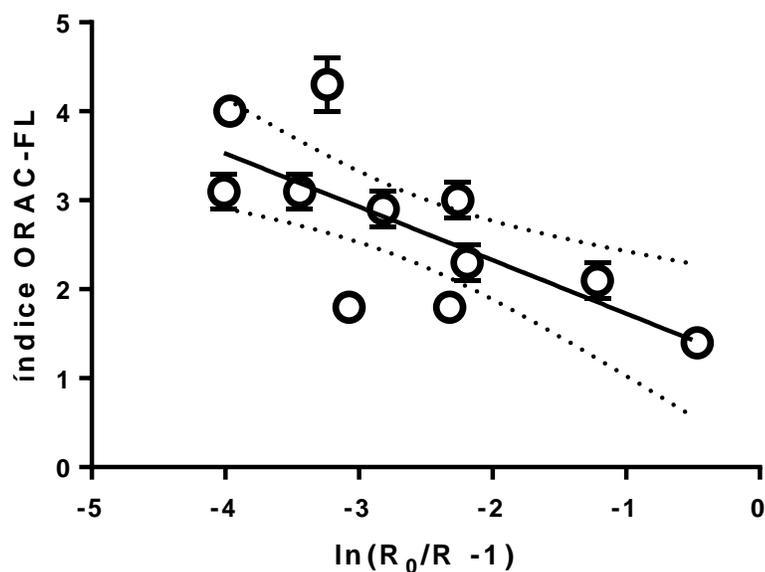


Figura 29 Gráfico de los índices ORAC-FL frente a la reactividad normalizada.

6.4 Ensayo ORAC-EPR.

Con el propósito de profundizar y confirmar los resultados de reactividad obtenidos mediante ORAC-FL, se desarrolló la metodología de ORAC-EPR. Para este ensayo se seleccionaron cinco compuestos, de los cuales dos fueron los menos reactivos y con mayores índices ORAC-FL (AC1 y AC5), uno de reactividad intermedia y bajo índice ORAC-FL (AC7) y dos compuestos de alta reactividad y los menores índices ORAC-FL (AC3 y AC13). Este ensayo está diseñado para evaluar la reactividad frente al radical alcoxilo generado por fotólisis de AAPH, en la cual se compara la reactividad presentada por el AHC contra la reactividad del compuesto estándar Trolox, para obtener un índice ORAC-EPR referenciado a partir de los equivalentes de Trolox con la misma reactividad.

Al aumentar la concentración de antioxidante (entre 0,1 y 0,5 mM) se observa una disminución de la intensidad de la señal correspondiente a la concentración del aducto de espín [DMPO-OR]•, decaimiento que se ajusta al de tipo exponencial con el aumento de la concentración de antioxidante (**Figura 30**).

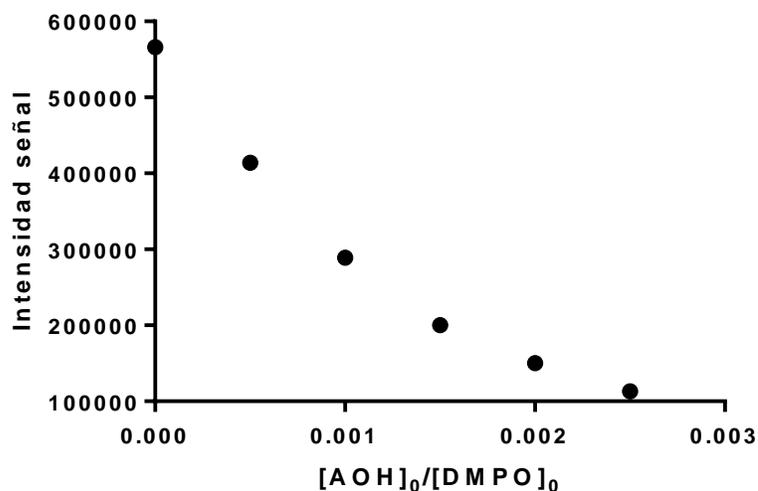


Figura 30 Decaimiento de la intensidad de la señal correspondiente al aducto DMPO-OR, derivado de la fotólisis del AAPH, a distintas concentraciones de AHC (o compuesto fenólico, AOH).

Graficando $\left(\frac{I_0}{I}\right) - 1$ versus $\frac{[AOH]_0}{[DMPO]_0}$, se obtuvo una recta de la cual la pendiente corresponde a k_{AOH}/k_{ST} (**Figura 31**) cuyos valores se muestran en la **Tabla VII**, junto con el valor comparado con la pendiente de Trolox.

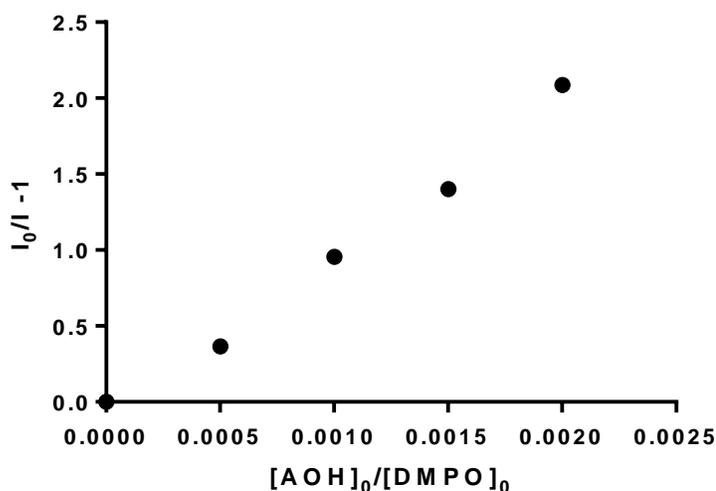


Figura 31 Gráfico de la razón de intensidades del aducto DMPO-OR en ausencia de AHC (I_0) y en presencia de de AHC (I) al aumentar la concentración de AHC (a una concentración fija de atrapador DMPO).

Tabla VII. Valores de la razón de constantes k_{AOH}/k_{ST} , índice ORAC-EPR, cuyo valor se expresa como equivalentes de Trolox (k_{AOH}/k_{Trolox}) y los índice ORAC-FL, cuyo valor se expresa como equivalentes de Trolox. Cada valor es el producto de una medición por triplicado cuya desviación estándar es menor al 10% de la media. Los índices ORAC-FL fueron calculados y presentados durante el primer avance, adicionando el de AC13.

Compuesto	k_{AOH}/k_{ST}	Índice ORAC-EPR	Índice ORAC-FL
Trolox	840	1	1
AC1	945	1,1	4,3
AC3	575	2,7	1,4
AC5	1380	1,6	4,0
AC7	1009	1,1	2,9
AC13	5208	6,2	1,8

El índice ORAC-EPR del ácido cafeico (AC1) ha sido reportado por algunos autores, con valores de 1,8 [18] y 1,1 [12], que coinciden con el obtenido en este trabajo. Comparando los índices ORAC-EPR y ORAC-FL se observa que hay diferencias tanto en el valor absoluto como en la correlación entre los compuestos de la serie, esto puede deberse a que corresponden a metodologías distintas, mientras en el ensayo ORAC-EPR la capacidad antioxidante es medida por seguimiento de la concentración del espín aducto generado con distintas concentraciones crecientes de antioxidante, en ORAC-FL se monitorea la protección a la oxidación de una sonda fluorescente en el tiempo por efecto de la adición de concentraciones crecientes de antioxidantes; en otras palabras, en la metodología de ORAC-EPR desarrollada se está evaluando la capacidad antioxidante mediante la reactividad del compuesto por los radicales libres en competencia con el atrapador de espín, y en la metodología ORAC-FL se evalúa la estequiometría de la reacción entre el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) y el donador de átomos de hidrógeno. También es importante hacer mención a las diferencias en reactividad de los radicales libres generados en cada ensayo, siendo el radical alcoxilo ($\text{RO}\cdot$) (tiempo de vida media en el orden de los microsegundos) derivado de AAPH más reactivo que el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) derivado de AAPH (tiempo de vida media de 7 segundos) [84]. En la Tabla VI se observa que aquellos compuestos con mayores índices ORAC-EPR son los que presentan menores índices ORAC-FL, debido a su mayor reactividad y rápido consumo. Mientras que los que tienen menores índices ORAC-EPR son los que poseen los valores más altos de índice ORAC-FL en la serie, indicando que son menos reactivos frente a los radicales alcoxilos y al poseer una permanencia más persistente proveen una mayor protección de la sonda FL, lo que se traduce en un alto índice ORAC-FL.

6.5 Ensayo de citotoxicidad en células de endotelio vascular humano (línea EA.hy 926) y células leucémicas humanas (línea HL-60), mediante la metodología de reducción del MTT.

Con el objetivo de evaluar el efecto citotóxico de los compuestos en estudio, se realizó el ensayo *in vitro* en los modelos celulares: EA.hy 926 (células de endotelio vascular humano), y HL-60 (células leucémicas).

Los compuestos estudiados presentaron baja toxicidad con respecto al control frente a las células EA.hy 926 (**Figura 32**), tal como se ha reportado anteriormente para el compuesto AC1 y AC2 [37]. El compuesto que presenta mayor toxicidad es AC7 a 100 μM . Por otro lado, estos compuestos presentan baja citotoxicidad frente a las células HL-60, siendo el único compuesto que presenta una diferencia significativa respecto al control ($p\text{-value} < 0,05$) el compuesto AC3 a 100 μM (**Figura 33**). Como se observa en la **Tabla VIII**, el índice de selectividad, que se ha definido como el porcentaje de viabilidad en células EA.hy 926 con respecto a las células HL-60, es mayor para el compuesto AC3; siendo éste el compuesto más interesante, por poseer mayor actividad citotóxica en células leucémicas de la serie y menor toxicidad en células sanas. Para los demás compuestos el valor de este índice fue muy próximo a la unidad, indicando que no hubo selectividad entre ambas líneas celulares.

Se observa que la presencia del anillo galoil es importante para esta actividad anticancerígena en la línea celular estudiada *in vitro*, pues la ausencia del grupo 5-OH disminuye significativamente la actividad (AC1 %viabilidad $\sim 84 \mu\text{M}$; AC3 %viabilidad $\sim 66 \mu\text{M}$). Otros compuestos con anillos galoil han sido descritos como compuestos con actividad anticarcinogénica en células HL-60 mediante actividad un mecanismo de inhibición enzimática de Xantina-oxidasa y de modulación en la generación de ROS [11, 123].

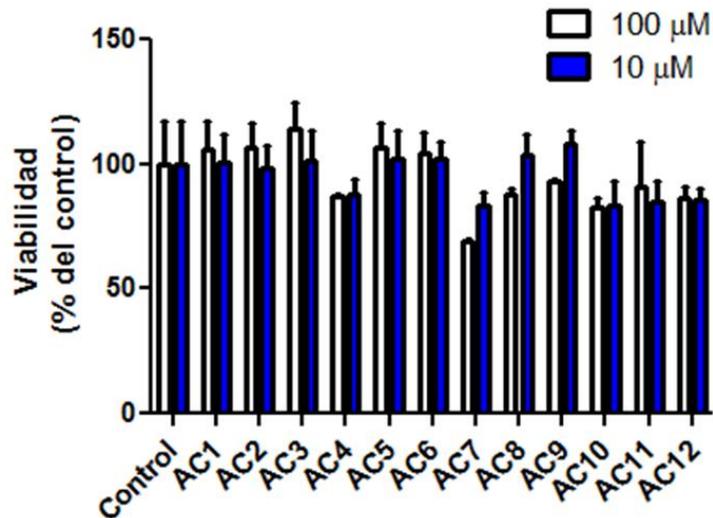


Figura 32 Porcentaje de viabilidad en células EA.hy 926 con los distintos derivados de ácido cinámico a 10 y 100 μM . Los datos están presentados como promedio \pm SD de triplicados. Las diferencias con respecto al control fueron analizadas mediante ANOVA de mediciones repetidas, seguidas de un análisis de Tukey. * $p < 0,05$.

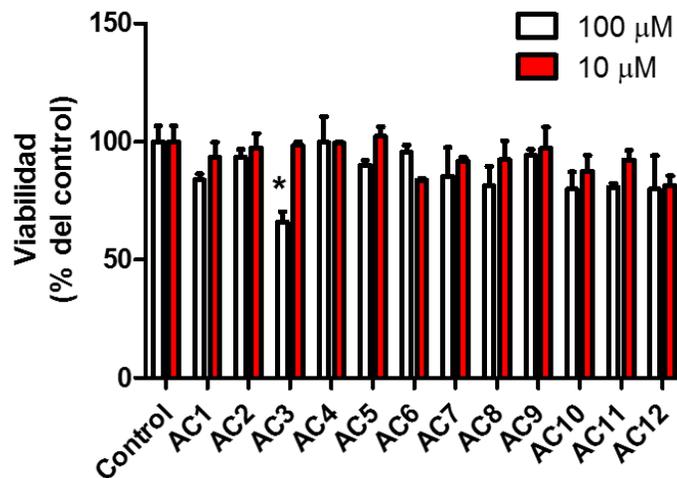


Figura 33 Porcentaje de viabilidad en células leucémicas de HL-60 con los distintos derivados de ácido cinámico a 10 y 100 μM . Los datos están presentados como promedio \pm SD de triplicados. Las diferencias con respecto al control fueron analizadas mediante ANOVA de mediciones repetidas, seguidas de un análisis de Tukey. * $p < 0,05$.

Tabla VIII. Viabilidad, o porcentaje de disminución de células vivas con respecto al control (sin AHC), de cada compuesto a 100 μ M en ambas líneas (EA.hy926 y HL-60). El índice de selectividad se define como la razón en viabilidad entre EA.hy926/HL-60.

Compuesto	Viabilidad (% del control) 100 μ M		Índice de selectividad
	EA.hy926	HL-60	
AC1	105,98 \pm 11,27	83,76 \pm 2,68	1,09
AC2	106,45 \pm 10,17	93,42 \pm 3,27	0,98
AC3	114,29 \pm 10,25	65,89 \pm 4,57	1,52
AC4	87,17 \pm 0,40	99,66 \pm 10,84	0,87
AC5	106,46 \pm 10,08	90,14 \pm 2,08	0,99
AC6	104,23 \pm 8,48	95,52 \pm 3,01	0,92
AC7	69,23 \pm 0,31	85,4 \pm 12,1	0,81
AC8	87,51 \pm 2,38	81,37 \pm 8,17	1,08
AC9	93,30 \pm 0,30	94,32 \pm 2,36	0,84
AC10	82,53 \pm 4,14	79,90 \pm 7,31	1,00
AC11	90,81 \pm 18,25	80,72 \pm 1,70	0,97
AC12	86,70 \pm 4,12	79,93 \pm 14,07	1,05

6.6 Reparto en vesículas unilamelares de DODAC y liposomas de DPPC.

Para determinar el reparto entre membranas lipídicas/agua, se generaron los espectros derivativos a concentración fija de antioxidante y aumentando la concentración de liposomas (**Figura 34-A**), de donde se midió cada pico y/o valle para realizar la gráfica de $[L]/\Delta D$ versus $[L]$ hasta obtener regresiones lineales (**Figura 34-B**) de acuerdo a lo descrito por la **Ecuación 18**.

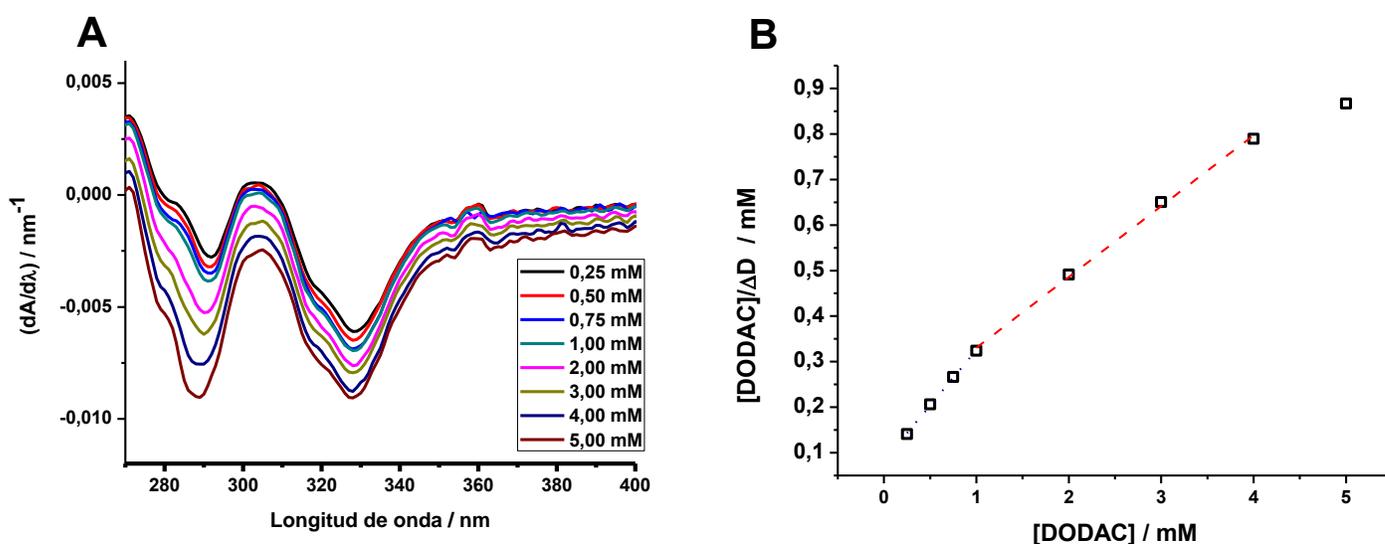


Figura 34 (A) Espectro de la primera derivada ($dA/d\lambda$) en un barrido de longitudes de onda entre 200-400 nm de AC2; (B) Gráfico de $[L]/\Delta D$ versus $[L]$ del compuesto AC2.

El coeficiente de reparto de estos compuestos se determinó en los sistemas DODAC/agua y DPPC/tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). Mientras DODAC corresponde a un lípido con cargado positivamente, DPPC es una especie zwitteriónica en las condiciones de trabajo. Entre los sistemas de liposomas no se observa diferencia entre el reparto de los distintos compuestos en los dos sistemas de liposomas/medio acuoso. Por otro lado, el reparto en los sistemas microheterogéneos es aproximadamente cinco veces mayor en magnitud que en los sistemas n-octanol/agua (**Figura 35**), dando cuenta que el efecto electroestático

es la mayor contribución a la sorción de estos compuestos. Las diferencias eléctricas de los compuestos no permite la variabilidad en la sorción en los sistemas microheterogéneos estudiados (**Tabla IX**).

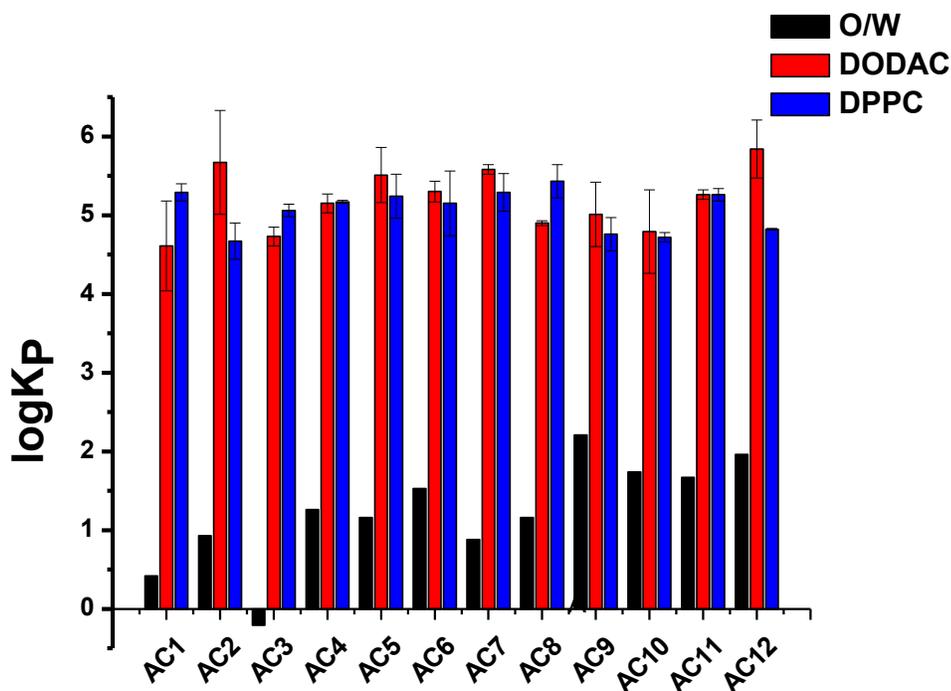


Figura 35 Valores de $\log P$, $\log K_p$ (DODAC) y $\log K_p$ (DPPC) de cada compuesto.

Tabla IX. Valores obtenidos de $\log K_P$ (DODAC) y $\log K_P$ (DPPC) de cada compuesto.

Compuesto	$\log K_P$ (DODAC)	$\log K_P$ (DPPC)
AC1	$4,61 \pm 0,57$	$5,29 \pm 0,11$
AC2	$5,67 \pm 0,66$	$4,67 \pm 0,23$
AC3	$4,73 \pm 0,12$	$5,06 \pm 0,08$
AC4	$5,15 \pm 0,12$	$5,17 \pm 0,02$
AC5	$5,51 \pm 0,35$	$5,24 \pm 0,28$
AC6	$5,30 \pm 0,13$	$5,15 \pm 0,41$
AC7	$5,58 \pm 0,06$	$5,29 \pm 0,24$
AC8	$4,90 \pm 0,03$	$5,43 \pm 0,21$
AC9	$5,01 \pm 0,41$	$4,76 \pm 0,21$
AC10	$4,79 \pm 0,53$	$4,72 \pm 0,06$
AC11	$5,26 \pm 0,06$	$5,26 \pm 0,08$
AC12	$5,84 \pm 0,37$	$4,82 \pm 0,01$

6.7 Anisotropía de Fluorescencia en estado estacionario en liposomas de DPPC/POPC y fantasmas de eritrocitos.

Los resultados obtenidos para la sonda DPH se presentan en la **Figura 36**. La incubación de los liposomas de DPPC/POPC con los compuestos no presentaron cambios significativos en los valores del parámetro de anisotropía $r(\text{DPH})$ con el incremento de la compuesto prueba. Los resultados para $r(\text{TMA-DPH})$ indican que los compuestos no afectan la anisotropía de fluorescencia de TMA-DPH. Sin embargo, al emplear la sonda ANS se observan cambios en el parámetro $r(\text{ANS})$, donde los compuestos AC3 y AC7 conducen a una disminución gradual en la fluidez de la membrana, mientras que los compuestos AC1 genera perturbación en la fluidez del microambiente a concentraciones superiores a 100 μM ; por otro lado, el compuesto AC5 genera aumento de la fluidez de la membrana cuando la razón compuesto/lípido es baja, posteriormente se observa un aumento del parámetro $r(\text{ANS})$, que indica una disminución de la fluidez en el microentorno más superficial de la membrana. Es interesante la comparación entre AC5 y AC7, ya que ambos poseen un anillo bencénico en la posición 5, sin embargo AC5 a bajas concentraciones tiende a aumentar la fluidez en el microentorno de ANS, mientras que AC7 la disminuye a las misma razón sonda/AHC. Debido a que los cambios notados con la sonda ANS son los mayores que los obtenidos con las otras sondas, se puede especular que los compuestos se localizan preferentemente en la interfase membrana lipídica/agua, posiblemente mediante interacciones electrostáticas entre el grupo carboxilato del AHC (cargados negativamente) y el grupo colina (cargado positivamente) de la cabeza polar de los fosfolípidos (**Figura 37**). Cabe destacar que se observó la misma tendencia cuando se realizó este estudio empleando fantasmas de eritrocitos, corroborando que los AHC se encontrarían localizados en la región más superficial de la interfase membrana/medio acuoso.

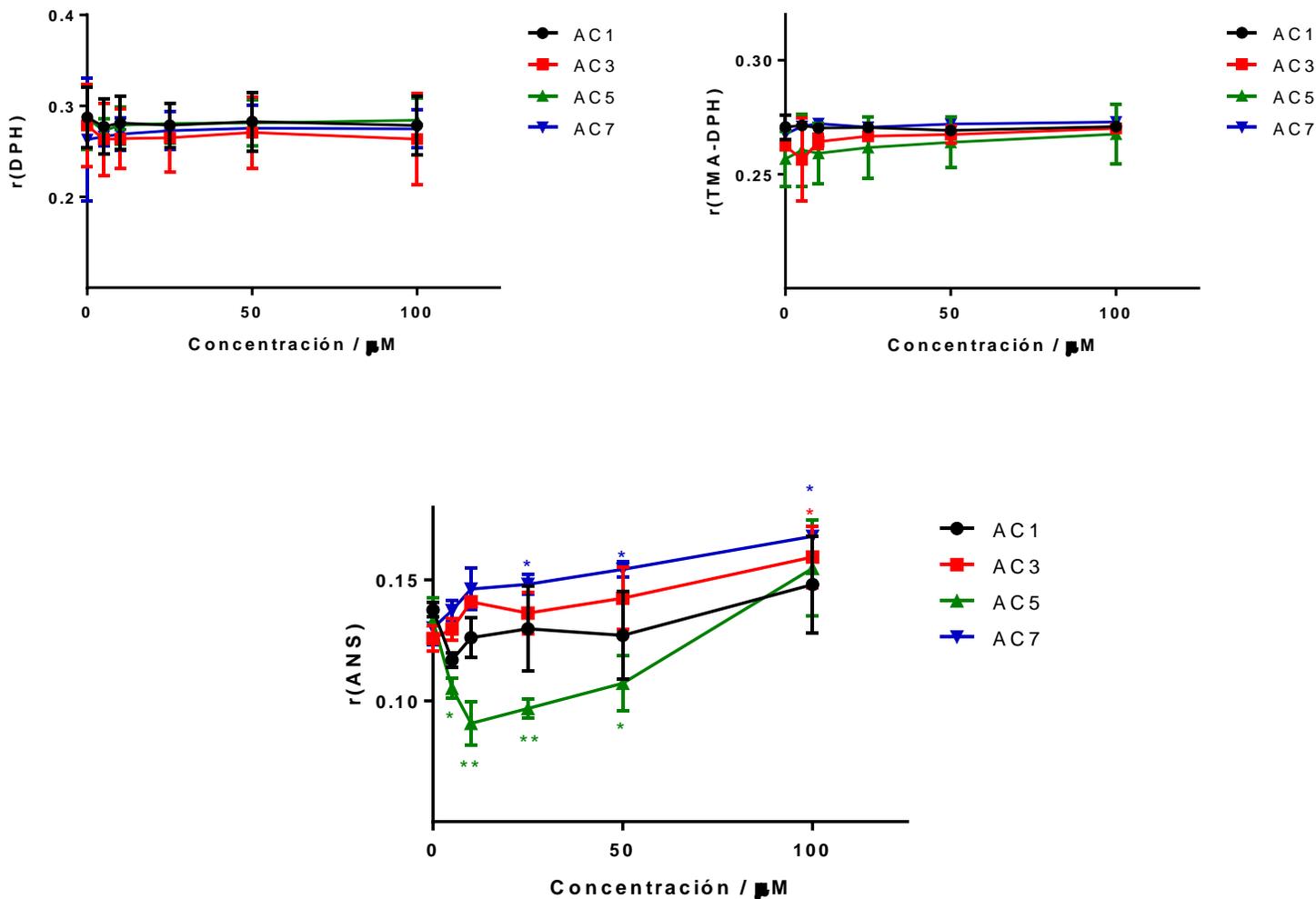


Figura 36 Gráficos de anisotropía de fluorescencia (r) en liposomas de DPPC a concentración constante de sonda ($1 \times 10^{-6} M$) DPH, TMA-DPH y ANS frente a incrementos de la concentración de AHC (5-100 μM) a temperatura ambiente. Cada medición es realizada en triplicado, donde se ha graficado el promedio y la respectiva desviación estándar. Las diferencias con respecto al control fueron analizadas mediante ANOVA de mediciones repetidas, seguidas de un análisis de Tukey. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$.

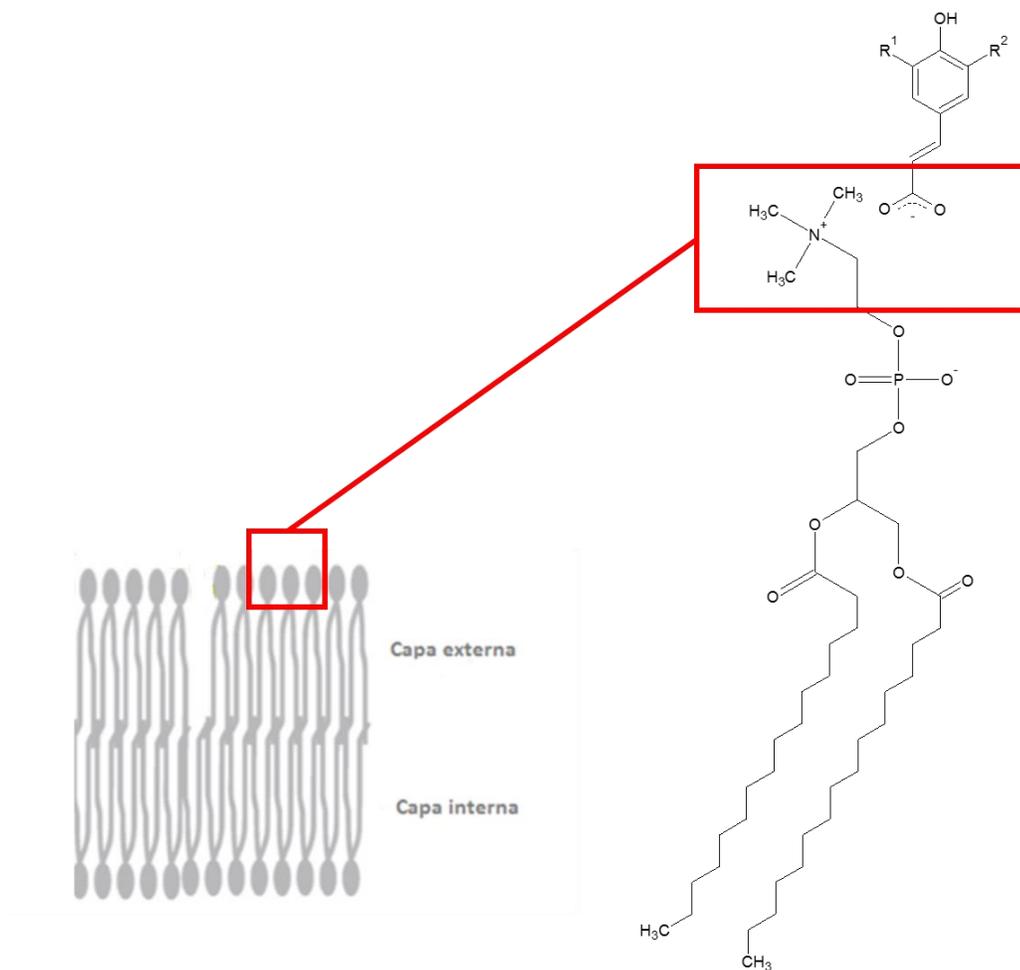
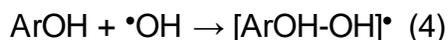
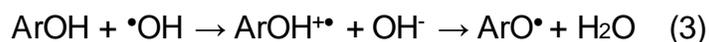
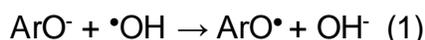


Figura 37 Diagrama de la posible interacción entre los derivados de ácido hidroxicinámico y las bicapas lipídicas de fosfolípidos.

6.6 Reactividad frente al radical hidroxilo generado por fotólisis en vesículas de DODAC, liposomas de DPPC, DPPC/POPC y membranas de eritrocitos.

La reacción entre el radical hidroxilo y el ácido cinámico en medio neutro transcurriría mediante transferencia electrónica directa (mecanismo ET, *electronic transfer*) del grupo carboxilato al radical hidroxilo, generando el radical carboxilato y el ion hidroxilo. Los derivados hidroxilados pueden seguir diferentes vías como: la transferencia de un electrón al radical (mecanismo ET, *electronic transfer*) (Reacción 1), la transferencia de un átomo de hidrógeno (mecanismo HAT, *hydrogen atom transfer*) (Reacción 2), transferencia secuencial de protón y un electrón (mecanismo SPLET, *sequential proton loss-electron transfer*) (Reacción 3). Otro mecanismo propuesto para el apagamiento del radical hidroxilo es la formación de aductos radicalarios (mecanismo RAF, *radical-adduct formation mechanism*)[124, 125] (Reacción 4) en la cual la adición puede ocurrir directamente en el enlace etilénico o en el anillo aromático. El balance entre estos mecanismos depende tanto del medio de reacción como de los reactantes [124, 126], mientras el mecanismo HAT se ve más favorecido en medios apolares, el mecanismo SPLET lo es en medio de mayor polaridad, y el mecanismo ET es más favorecido en medios de pH alcalinos.



La reacción química puede ser seguida por monitoreo del consumo del ácido hidroxicinámico en el tiempo. En el ensayo en medio homogéneo, la cinética de reacción se ajusta a un proceso de pseudo-primer orden, de acuerdo a la ecuación:

$$v = -\frac{d[ArOH]}{dt} = \left(k_{SPLET} \times \frac{K_{eq}}{[H^+]} + k_{HAT} + k_{RAF} \right) \times [HO^\bullet][ArOH] = k_{obs}[ArOH]$$

Donde k_{SPLET} es la constante de reacción para un mecanismo de tipo SPLET, k_{HAT} es la constante de reacción para un mecanismo de tipo HAT y k_{RAF} es la constante de reacción para un mecanismo RAF. K_{eq} es la constante de equilibrio entre las especies $ArOH/ArO^-$, y $[H^+]$ es la concentración en el equilibrio de los protones del medio, $[HO^\bullet]$ es la concentración en estado estacionario del radical hidroxilo y k_{obs} es la constante de velocidad de pseudo-primer orden experimental. Controlando las condiciones experimentales como concentración del agua oxigenada (10 % v/v), intensidad de la luz irradiada (100 W), temperatura ambiente y celda de cuarzo, la concentración de radical hidroxilo generada es constante en cada experimento. De esta forma, la razón entre k_{obs} (1 y 2) permite comparar la reactividad química entre distintos ácidos hidroxicinámicos,

$$\frac{k_{obs,1}}{k_{obs,2}} = \frac{k_1}{k_2}$$

Los resultados indican que el orden de reactividad de menor a mayor es $AC7 \leq AC1 < AC5 \ll AC3$ (**Tabla X**), donde se observa que todos los compuestos presentan una reactividad similar tanto en el medio homogéneo como en el medio microheterogéneo, y además, presentó un comportamiento similar en un sistema compuesto por lípidos saturados e insaturados. También se aprecia que no existen diferencias significativas de reactividad en el sistema con liposomas catiónicos y zwitteriónicos. Estos antecedentes indican que los ácidos hidroxicinámicos estudiados deben efectivamente disponerse en la interfase cargada del liposoma, por esta razón el orden de reactividad se conserva en medio homogéneo y en medio microheterogéneo. La excepción fue el compuesto AC3, que posee el anillo de galoil, que triplica su reactividad en el sistema compuesto por DPPC:POPC y la duplica en el sistema compuesto por fantasmas de eritrocitos, este efecto puede deberse a la disposición ordenada de compuesto fenólico en la interfase, direccionando los hidroxilos hacia el medio dispersante; y por otro lado, verse menos pronunciado en el sistema compuesto membranas de eritrocitos por la

presencia de proteínas de membrana que pueden estar interactuando con el compuesto AC3. A causa de esto, las razones de reactividad entre los compuestos se mantienen constantes al cambiar de sistemas (**Tabla XI**), sin embargo aumentan entre 11-20 veces en el medio microheterogéneo compuesto por DPPC:POPC por el importante aumento en reactividad del compuesto AC3.

Tabla X. Constantes de velocidad experimental (s^{-1}) obtenidas a partir de los gráficos de absorbancia normalizada al valor inicial (A/A_0) de cada AHC versus el tiempo, en medio homogéneo de tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,4, vesículas de DODAC, liposomas de DPPC, DPPC/POPC y fantasmas de eritrocitos. Para AC3 no se determinaron los valores en DODAC y DPPC por ser muy elevado el consumo de este AHC.

Constante de velocidad experimental (k_{obs}) / $\times 10^3 s^{-1}$					
Compuesto	Medio homogéneo	Vesículas DODAC	Liposomas DPPC	DPPC:POPC (70:30)	Membranas eritrocitos
AC1	1,32 \pm 0,02	2,42 \pm 0,20	1,48 \pm 0,21	1,48 \pm 0,28	2,86 \pm 0,06
AC3	7,72 \pm 0,50	n.d.	n.d.	23,0 \pm 3,9	12,4 \pm 3,2
AC5	4,30 \pm 0,20	3,27 \pm 0,23	3,63 \pm 0,31	2,04 \pm 0,16	3,49 \pm 0,16
AC7	1,19 \pm 0,04	1,26 \pm 0,04	1,36 \pm 0,04	1,12 \pm 0,21	1,99 \pm 0,40

Tabla XI. Razón de constantes experimentales entre los AHC en estudio en los diversos medios de reacción.

k_1/k_2	Razón entre constantes de velocidad experimentales				
	Medio homogéneo	Vesículas DODAC	Liposomas DPPC	Liposomas DPPC:POPC	Membranas eritrocitos
AC3/AC1	5,8	-	-	15,5	4,3
AC5/AC1	3,3	1,6	2,5	1,4	1,2
AC7/AC1	0,9	0,5	0,9	0,8	0,7
AC3/AC5	1,8	-	-	11,3	3,6
AC3/AC7	6,5	-	-	20,5	6,2
AC5/AC7	3,6	2,6	2,7	1,8	1,8

6.7 Actividad antioxidante intracelular empleando menadiona mediante la metodología de *spin-trapping*.

Con el propósito de evaluar el efecto que presentan estos compuestos en la generación de ROS en las células se procedió a realizar un ensayo cualitativo en ambos modelos celulares mediante la metodología de *spin-trapping* con DMPO de cinco de los compuestos seleccionados de la serie (AC1, AC3, AC5, AC7 y AC13). Se realizó un blanco compuesto por las células EA.hy 926 + DMPO + NADPH, un control en el que se agregó menadiona como generador de especies radicalarias intracelular; posteriormente se agregó cada compuesto en una concentración de 10 μM en celda, se esperó por 30 min y se midió en el EPR.

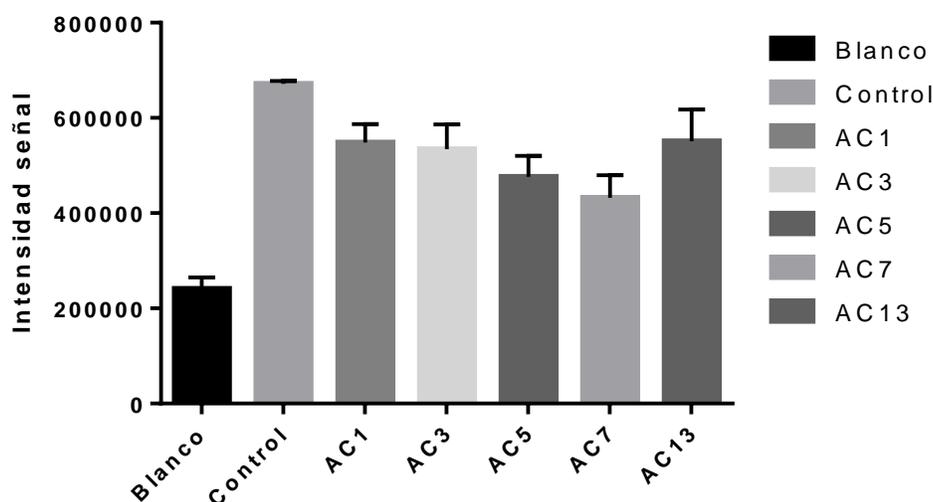


Figura 38 Histograma de la intensidad de la señal (3460 G) del espectro correspondiente a la formación del aducto radicalario DMPO-OH. El blanco corresponde a la generación de especies radicalarias en ausencia del estresor menadiona y de AHC, el control presenta menadiona pero ausencia de AHC, las barras de AC1, AC3, AC5, AC7 y AC13 presentan la misma concentración de menadiona y la misma concentración de cada AHC (10 μM).

En este gráfico (**Figura 38**) se observa la generación basal de especies radicalarias debido a la metabolismo propio de las células, al incorporar menadiona en el sistema se observa un aumento en la generación de especies

radicalarias de ~ 64 %. Al incorporar los distintos AHC en el sistema se observa que hay una disminución en la concentración intracelular de especies radicalarias intracelulares, de lo que se puede inferir que los compuestos ingresan en la célula ejerciendo una actividad antioxidante intracelular. Por otro lado, todos los compuestos presentaron disminución similar entre sí.

6.8 Actividad antioxidante celular (AAC).

En el ensayo de AAC se midió la aparición de fluorescencia a $\lambda_{ex} = 485$ nm y $\lambda_{em} = 538$ nm producto de la oxidación de la sonda fluorescente diclorodihidrofluoresceína cuando es incubado en células de la línea EA.hy926. El control consistió en la intensidad de fluorescencia producido por las células en presencia del estresor AAPH. Se midió además un blanco correspondiente a la aparición de las células sin perturbar, solamente incubadas con la sonda, cuyo valor es indicador de la generación basal de radicales libres por parte de las células producto del metabolismo propio, cuyo valor es restado de los obtenidos para las demás mediciones con el propósito de determinar las variaciones debidas al someter a las células a estrés oxidativo. Se realizó además una serie de ensayos con los AHC AC1, AC3, AC5, AC7 y AC13 a 1 y 10 μ M. El %AAC se expresa como la disminución porcentual con respecto al control (100 %), de este modo, el mayor %CAA es atribuible al AHC con mayor actividad antioxidante en este ensayo (**Tabla XII**). Se observa que todos los AHC redujeron de manera significativa el estrés oxidativo celular evidenciado mediante la protección frente a la oxidación de la sonda intracelular. La tendencia del % AAC fue, de menor a mayor actividad, AC1 < AC7 < AC13 < AC3 ~ AC5, cuando presentes en la concentración 1 μ M, mientras que a 10 μ M fue: AC1 ~ AC7 \leq AC13 < AC3 < AC5. Observándose que el compuesto con menor actividad antioxidante fue AC1, mientras que los compuestos con mejor

actividad fueron AC3 y AC5. Es interesante notar que esta tendencia es concordante con la obtenida para la reactividad de estos antioxidantes frente al radical hidroxilo en membranas de eritrocitos, evidenciando un comportamiento que sigue el mismo patrón cuando se emplea un estresor extracelular (AAPH).

Tabla XII. Valores de %AAC ($\%AAC = \{(F_{CONTROL} - F_{AHC})/F_{CONTROL}\} \times 100$), donde $F_{CONTROL}$ es la pendiente de la fluorescencia normalizada en el tiempo para la muestra con células endoteliales en presencia de AAPH y ausencia de AHC. F_{AHC} es la pendiente de la recta de fluorescencia normalizada en el tiempo para los AHC en concentraciones de celda de 1 y 10 μM . A todos los valores de fluorescencia se le resta el de la pendiente del blanco que sólo contiene tampón fosfato a pH 7,4. Condiciones experimentales: $[AAPH] = 600 \mu\text{M}$, $[DCFH_2\text{-DA}] = 20 \mu\text{M}$, $[AHC] = 1$ y $10 \mu\text{M}$. Las mediciones se realizan con $n \geq 3$, y los valores son entregados como promedio \pm desviación estándar. Todos los valores fueron significativos con respecto al control y los valores indicados con asterisco presentan diferencias significativas (* $p < 0,05$) entre ambas concentraciones de AHC.

Compuesto	% Actividad antioxidante celular	
	1 μM	10 μM
AC1	8,8 \pm 1,8	17,3 \pm 1,6 *
AC3	33,3 \pm 1,8	31,3 \pm 8,0
AC5	36,0 \pm 3,2	48,5 \pm 3,5 *
AC7	17,4 \pm 2,3	19,9 \pm 3,4
AC13	25,3 \pm 2,1	25,4 \pm 1,7

6.9 Reactividad frente al radical hidroxilo generado mediante la reacción de Fenton.

Se realizó el ensayo de apagamiento del radical hidroxilo generado por medio de la reacción de Fenton, donde los AHC pueden actuar frente al radical hidroxilo mediante el apagamiento del radical (scavenging) o por medio de la quelación del ion ferroso, evitando la generación del radical hidroxilo, por ambos mecanismos se observaría una disminución en la intensidad de las señales correspondientes al aducto radicalario DMPO-OH• (**Figura 39**). Primero, se llevó a cabo un control en ausencia de AHC, posteriormente se agregó 0,5 mM de cada AHC (concentración de Fe(II) de 0,5 mM y peróxido de hidrógeno 10%), obteniéndose en todos los casos la disminución de la señal en comparación con el control. Según la **Figura 40**, en orden creciente, los compuestos que apagaron con mejor efectividad la generación del aducto radicalario son los compuestos AC1~AC3~AC13<AC5<AC2<AC4<derivados del ácido 5-fenilferúlico. Aquellos compuestos con grupo catecol y galoil son los más activos, debido a su mayor capacidad quelante en comparación con los derivados de ácido ferúlico en los cuales se sustituye por un grupo metoxilo, debido a su mayor volumen y por lo tanto mayor impedimento estérico para la quelación del ion ferroso. También se observa que la incorporación del anillo 5-fenilo disminuye la generación del aducto radicalario. Todos los derivados del ácido 5-fenilferúlico (AC6-AC12) presentaron baja actividad en el apagamiento del aducto radicalario, siendo el menor activo el compuesto AC7.

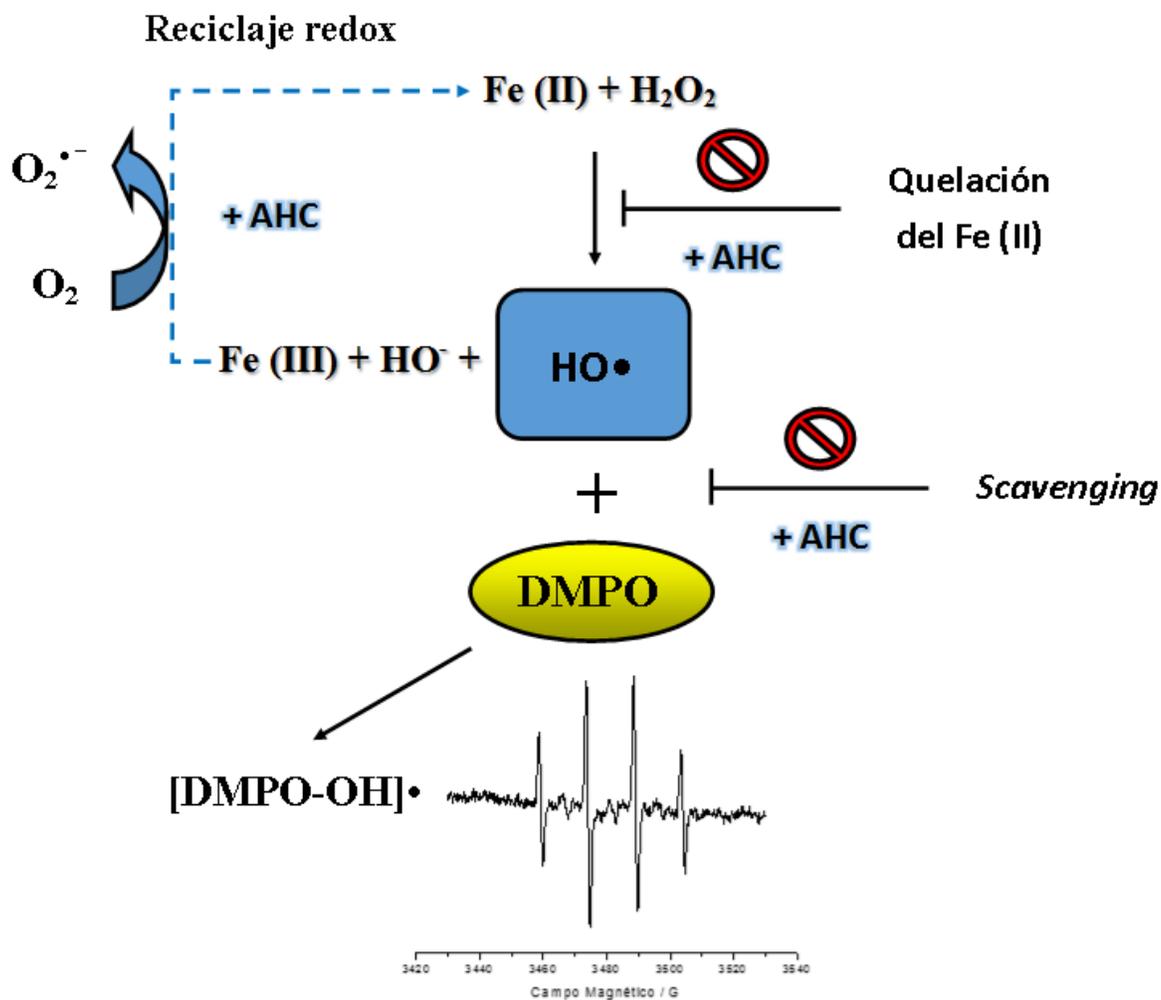


Figura 39 Diagrama de generación del aducto radicalario DMPO-OH, cuyo espectro presenta un patrón de 4 líneas con intensidades 1:2:2:1. Los AHC pueden actuar a dos niveles durante la generación del aducto radicalario, mediante el apagamiento o scavenging del radical $OH\bullet$, o mediante la quelación del metal activo Fe(II). Además los AHC pueden actuar mediante una vía alternativa de reciclaje redox, donde además se genera radical superóxido en presencia de oxígeno, que fomenta la generación del radical $OH\bullet$.

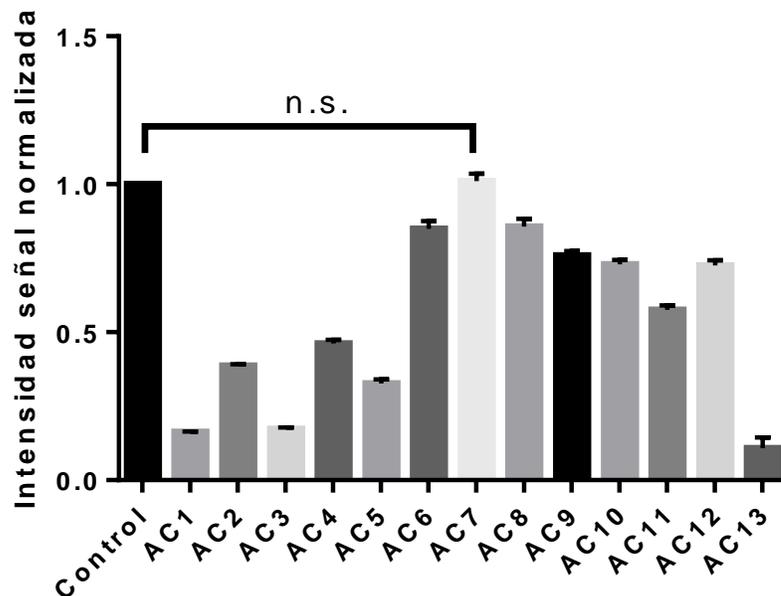
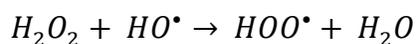
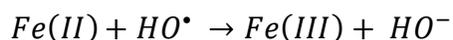
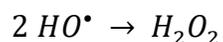


Figura 40 Histograma de la intensidad de señal normalizada con respecto al control, que carece de AHC, de los distintos AHC. Cada medición se realizó por triplicado, donde la altura de la barra es el promedio normalizado y el error corresponde a la desviación estándar. Se realiza el ensayo ANOVA, junto con el test de Tukey, donde todos los compuestos exhiben diferencias con respecto al control a un nivel de significancia de 0,1, a excepción del compuesto AC7 que no presentó diferencias significativas (n.s.) con respecto al control.

Se realizó un estudio aumentando la concentración de Fe(II) y manteniendo constantes las concentraciones de AHC (AC1, AC3, AC5, AC7, AC13) y la concentración de peróxido de hidrógeno (**Figura 40**). Se observa un aumento de la generación de DMPO-OH junto con el incremento de hierro de 0,5 a 1,5 mM, posteriormente a 3,0 y 4,5 mM ocurre un descenso en la generación del aducto radicalario debido a la disminución en la concentración efectiva de radicales hidroxilos, a causa del incremento de radicales hidroxilos en el sistema, lo que lleva a que se favorezcan reacciones secundarias como reacciones entre radicales OH•, por reacción con el ion Fe(II) o por reacción con el peróxido de hidrógeno [127]:



Cuando la relación entre ion ferroso y AHC es 1, todos los AHC disminuyen la formación del aducto radical, ya sea por quelación del ion ferroso o por *scavenging* del radical hidroxilo, es decir, presentan actividad antioxidante, siendo los más reactivos frente al radical hidroxilo $AC13 \sim AC3 < AC5 < AC7 < AC1$; esta tendencia coincide con los resultados obtenidos para el consumo de los AHC por los radicales hidroxilos generados por fotólisis en medio homogéneo presentados en la sección anterior (Tabla X). Si el Fe(II) se encuentra en una concentración tres veces superior al del AHC, aumenta la generación de radicales hidroxilos, el compuesto AC3 sigue actuando principalmente como antioxidante, el compuesto AC5 disminuye la diferencia con el control en comparación con la reactividad mostrada cuando $[Fe(II)]/[AC5] = 1$, indicando que la vía de reciclaje redox comienza a predominar en la relación $[Fe(II)]/[AC5] = 3$; el compuesto AC7 no presenta diferencias significativas con el comportamiento presentado a menores concentraciones de hierro, AC13 sigue actuando como un potente antioxidante y el compuesto AC1 comienza presentando propiedades pro-oxidantes al aumentar la generación de radicales hidroxilos. En una relación de $[Fe(II)]/[AHC] = 6$, en todos los compuestos se observa una disminución de la señal producto de la excesiva generación de radicales hidroxilos, comportamiento que se repite a $[Fe(II)]/[AHC] = 9$. En síntesis, los compuestos AC1 y AC5 presentan actividad antioxidante a bajas concentraciones de Fe(II), a concentraciones $\geq 1,5$ mM presentan actividad pro-oxidante. El compuesto AC7 presentó en todos los casos actividad antioxidante, debido a su baja capacidad como quelante de hierro por presentar un grupo metoxilo que dificulta la formación del complejo necesario para el reciclaje redox. Los compuestos AC3 y AC13 presentaron en todos los casos actividad antioxidante superior a la de los demás compuestos de esta serie, debido al mayor impedimento para la formación del complejo por formación de un puente intramolecular, en el caso de AC3, y por la disminución en la capacidad de transferencia electrónica

interna al centro metálico por efecto de un sustituyente fuertemente electroattractor, en el caso de AC13.

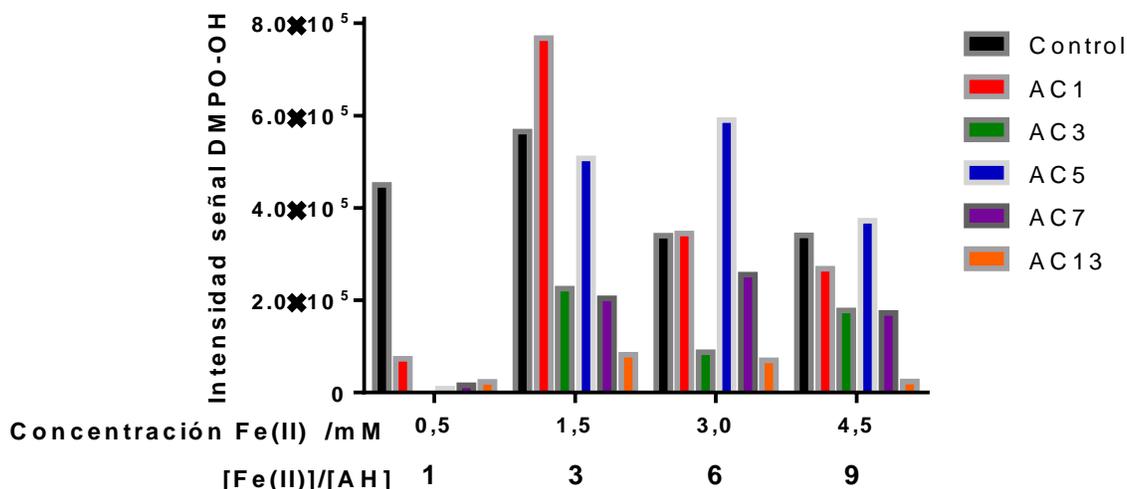


Figura 41 Histograma de la intensidad de la señal de 3460 G del aducto radicalario DMPO-OH para los compuestos AC1, AC3, AC5, AC7 y AC13, manteniendo fija la concentración de AHC (0,5 mM) y aumentando la concentración de hierro (II) entre 0,5 y 4,5 mM. Las mediciones se realizaron en tampón fosfato 0,1 M con pH ajustado 7,4 y a temperatura ambiente. Cada medición se realizó por triplicado, donde la desviación estándar fue menor o igual al 10%.

Con el objetivo de dilucidar si el mecanismo pro-oxidante de los AHC transcurre mediante reciclaje redox, se escogieron los compuestos AC1 (catecol), AC3 (galbil), AC7 (3-metoxi-4-hidroxifenil) y AC13 (3-nitro-4-hidroxifenil) para determinar la constante de formación del complejo AHC/Fe(III) y la estequiometría de éste. Sólo el compuesto AC1 presentó una señal nueva detectable atribuible a la formación del complejo férrico (**Figura 42**), mientras los demás compuestos estudiados no quelan, de manera detectable, el ion férrico en las condiciones experimentales.

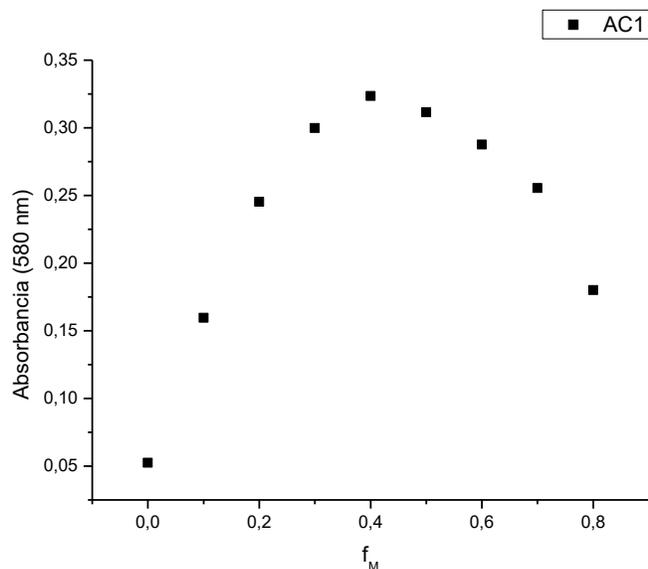


Figura 42 Gráfico de la absorbancia a 580 nm atribuible al complejo AC1/Fe(III) en tampón fosfato a pH 7,4. Las mediciones se realizaron a distintas fracciones molares del metal ($f_M = [Fe(III)] / ([AC1] + [Fe(III)])$).

A pH 7,4 se observó que sólo AC1 forma predominantemente un complejo del tipo 2:1, dejando dos posiciones vacantes por donde se coordina con dos moléculas de agua (**Figura 43**) [128]. Los demás compuestos estudiados no complejaron el hierro (III) en estas condiciones.

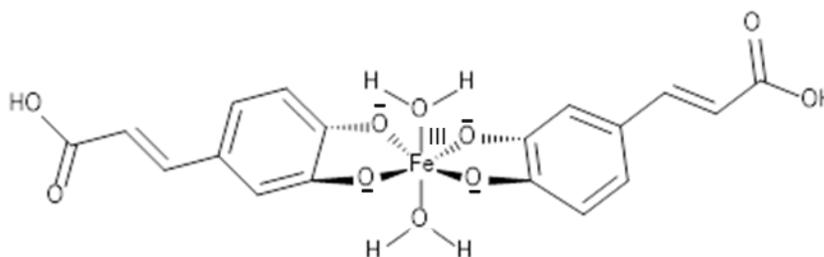
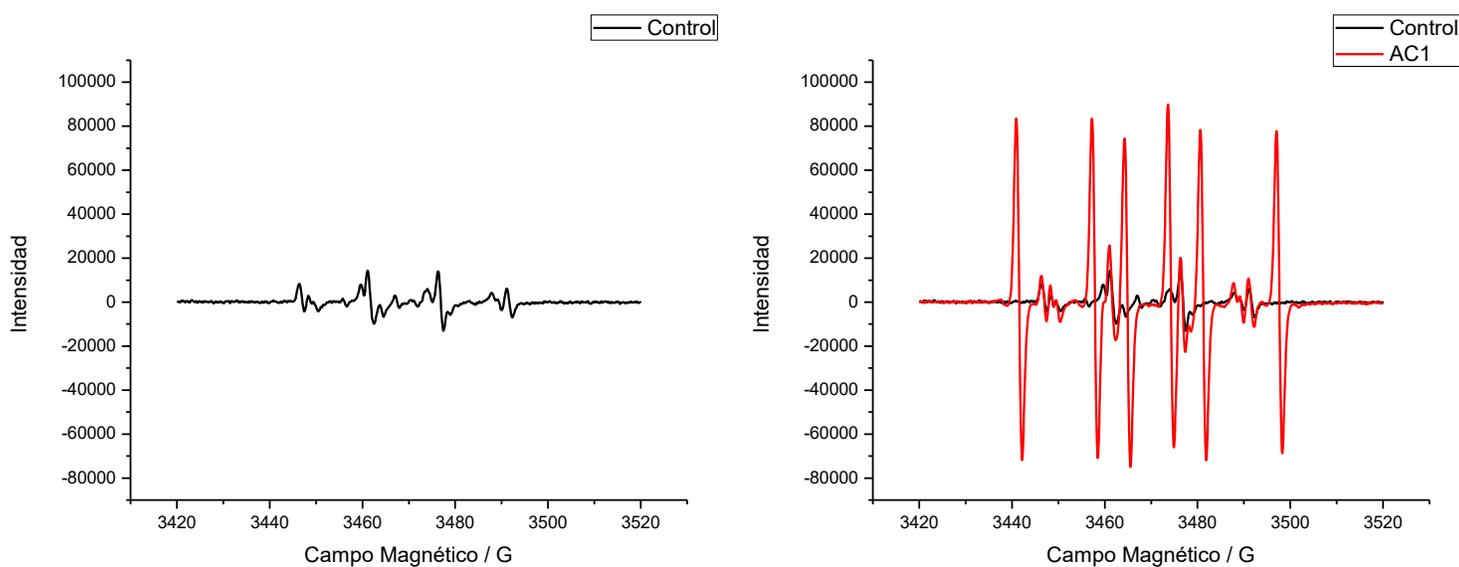


Figura 43 Representación de la estructura que poseería el complejo $[Fe^{III}(AC1)_2(H_2O)_2]Cl$.

Donde la constante de formación del complejo fue $\log\beta = 7,7 \pm 0,2$.

Esto indica que los compuestos con grupo catecol pueden efectivamente formar complejos con el Fe(III), los cuales podrían ser reducidos a Fe(II) mediante un proceso de transferencia intramolecular.

El fenómeno de reciclaje redox se confirma con la generación de especies radicalarias en un sistema conformado por FeCl₃ + AHC + DMPO + H₂O₂. En este sistema se observó que en el control (FeCl₃ + DMPO + H₂O₂) se forma una pequeña cantidad de radicales principalmente del tipo •OH, producto del equilibrio entre las especies Fe(III)/Fe(II) en agua. También se evidenció que AC1 aumentó la formación de aductos radicalarios, donde se observa una cantidad superior de radicales •OH y un aducto centrado en carbono que podría corresponder al radical •CH₃OH, empleado como co-solvente. (Figura 44, 45).



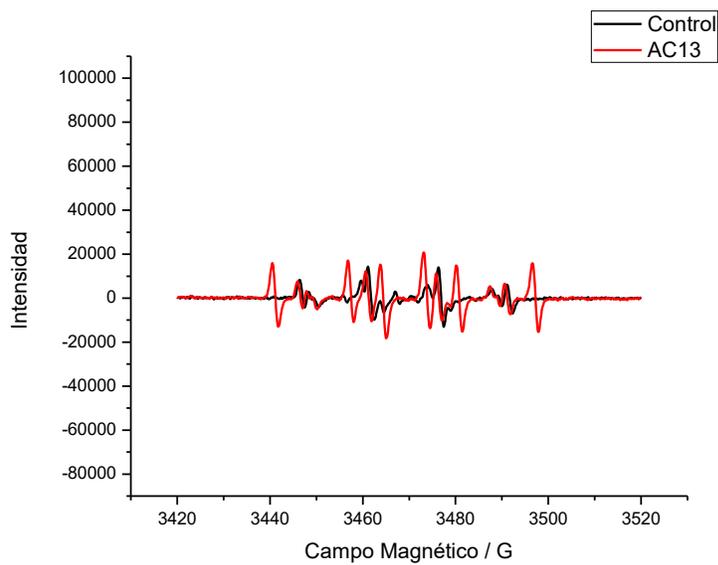
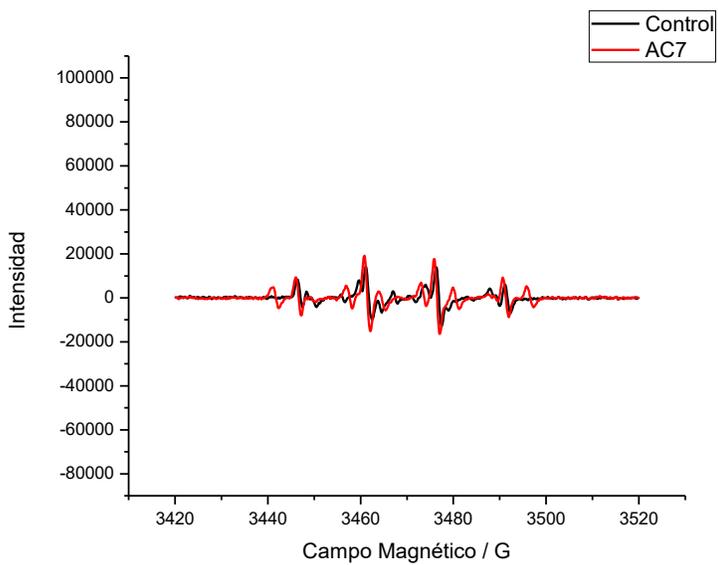
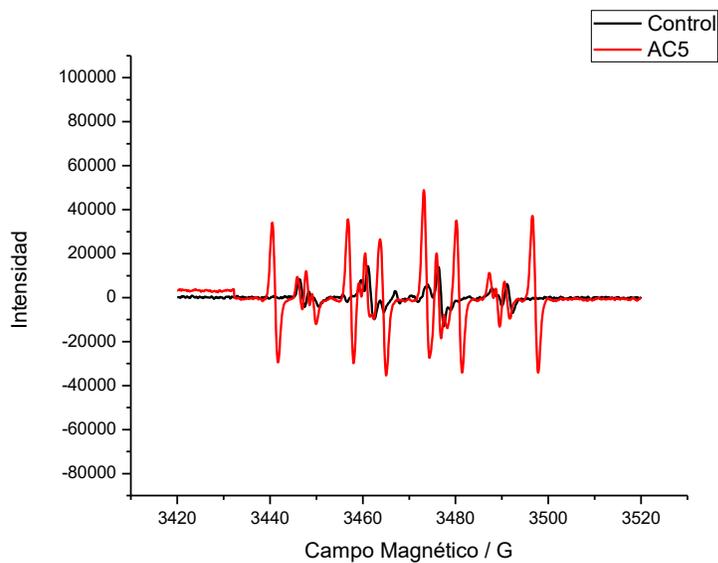
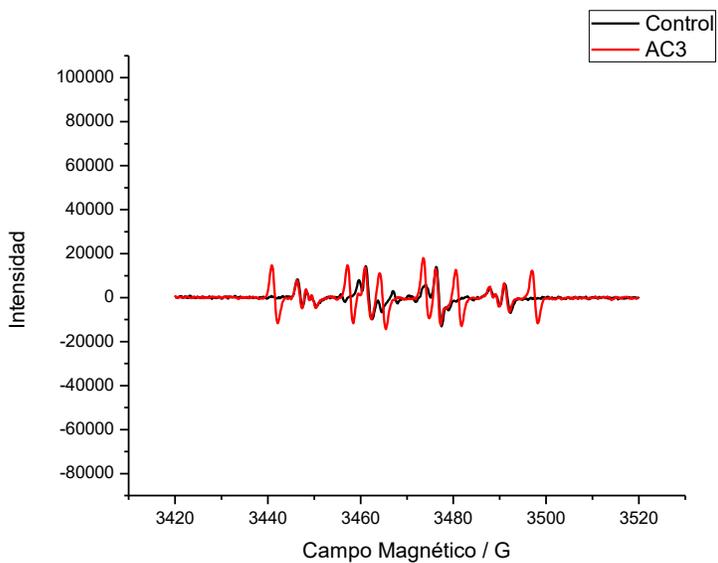


Figura 44 Espectros correspondientes a la formación del espín-aducto DMPO-OH•.

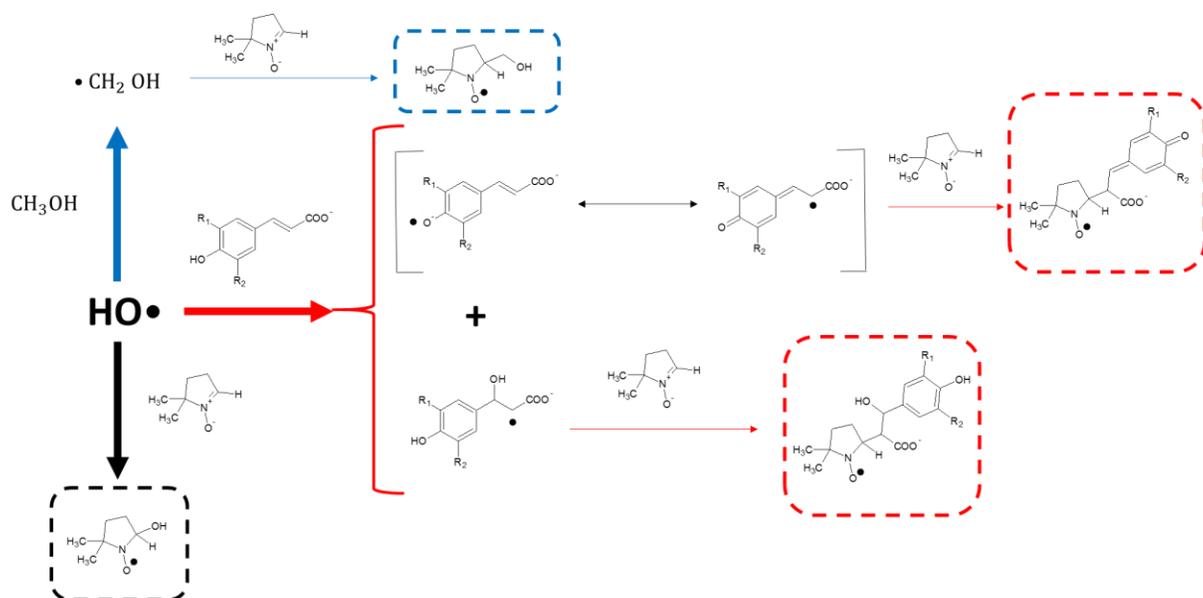


Figura 45 Diagrama de los posibles aductos radicalarios generados a partir del radical hidroxilo, del radical α -metilo (a partir del metanol que es co-solvente) y de los radicales del AHC originados por transferencia de un átomo de hidrógeno o por formación de aducto radicalario con el radical hidroxilo.

6.10 Estudio de la actividad pro-oxidante de los AHC en células HL-60 mediante *spin-trapping*.

En este estudio se incubaron células HL-60 (1×10^5 células/mL) con DMPO (200 mM en tampón fosfato) y los AHC AC1, AC3, AC5, AC7 y AC13 en tres concentraciones en celda, vale decir, 1, 10 y 100 μ M. Luego de 1 hora de incubación las muestras se midieron en el EPR. De este espectro se midió la integración de la señal de 3446 ± 1 G, producto del aducto DMPO-OH•. Todos los compuestos disminuyeron la concentración de especies radicalarias a concentración de 100 μ M (**Figura 46**), sin exhibirse diferencia significativa entre AHC frente a su actividad antioxidante, resultado semejante al obtenido en células EA.hy 926. Sin embargo, a 1 y 10 μ M, los compuestos AC1, AC3 y AC5 mostraron un aumento en la generación de ROS y los compuestos AC7 y AC13 no mostraron cambios significativos con respecto al control ($p < 0,05$). Los compuestos AC1 y AC5 que

generaron mayor ROS podría deberse a su capacidad de reciclaje redox. Mientras que el compuesto AC3 que presenta baja capacidad de reciclaje redox en relación a la cupla Fe(III)/Fe(II), el mecanismo por el cual exacerba la generación de ROS podría transcurrir por otros mecanismos internos celulares. La citotoxicidad del compuesto AC3 a 100 μ M no puede explicarse por un mecanismo pro-oxidante, debido a que presenta propiedades antioxidantes a esa concentración en las células HL-60. Algunos autores señalan que el comportamiento antioxidante de algunos polifenoles podría interferir en las vías de señalización intracelular de las células leucémicas y podría influenciar en la muerte celular [129].

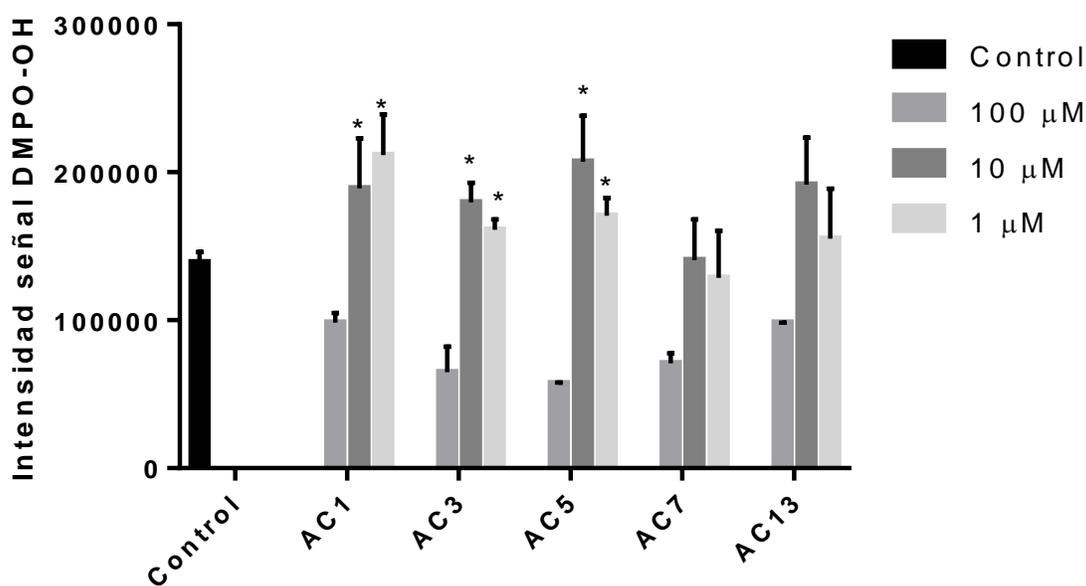


Figura 46 Histograma de la intensidad de la señal a 3446 G del espectro correspondiente a la formación del aducto DMPO-OH \cdot . * Aumento significativo ($p < 0,05$) de la intensidad de la señal del aducto radicalario DMPO-OH \cdot con respecto a la solución control.

7 Conclusiones.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los compuestos que poseen el grupo galoil (AC3) y catecol (AC1, AC5) en su estructura poseen los menores potenciales de oxidación, y por consiguiente, son los agentes reductores más potentes en la serie, a excepción del compuesto AC13, en el cual la presencia de un grupo fuertemente electroattractor ($-\text{NO}_2$) aumenta el potencial de oxidación en comparación con los otros derivados que también contienen al grupo catecol en su estructura. La existencia de un anillo 5-fenil, en los derivados de ácido ferúlico (AC2), disminuye el potencial de oxidación en comparación con el compuesto que carece de éste. Los compuestos con sustituyentes electroattractores en posición 4', disminuyeron en mayor medida el potencial que aquellos compuestos con sustituyentes electrodonores en la misma posición.

En el ensayo ORAC-FL, como indicador de la capacidad antioxidante de scavenging frente al radical peroxilo en un sistema homogéneo, demostró que el derivado con grupo galoil (AC3) y el compuesto AC13 es el que presenta menor capacidad antioxidante debido a la menor disponibilidad del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo más reactivo (7-OH); así como el derivado dimetoxilado del ácido 4-fenilferúlico (AC8) y el derivado bromado AC4. A continuación sigue el ácido ferúlico (AC2) y sus derivados (AC7-AC12) con índices en el rango de 2,1 y 3,1. Los compuestos con los grupos catecoles, AC1 y AC5, presentan los mayores índices. Los bajos índices ORAC-FL de AC3 y AC13 son debido a su alta reactividad que se traduce en un rápido consumo del compuesto y menor protección de la sonda fluorescente ante la oxidación.

De la serie de compuestos seleccionados, todos presentaron similar reactividad frente al radical alcoxilo ($\text{RO}\cdot$), a excepción del compuesto AC3 y AC13 que aumentó considerablemente su reactividad al incluir un grupo fuertemente electroattractor, lo cual es consistente con lo observado en ORAC-FL.

Los compuestos estudiados en este trabajo presentan baja toxicidad en células de epitelio vascular humano (EA.hy926) a concentraciones menores o iguales a 100 μM , además presentan propiedades antioxidantes intracelulares muy similares entre sí, según lo obtenido por el ensayo de EPR con menadiona como estresor intracelular ; por otro lado, el compuesto AC3 exhibe toxicidad a 100 μM en células leucémicas promielocíticas (HL-60), provocando la disminución del 44% de la población control a las 24 horas de incubación.

Cuatro compuestos seleccionados de la serie (AC1, AC3, AC5 y AC7) fueron estudiados en sistemas microheterogéneos de vesículas de DODAC y liposomas de DPPC, DPPC/POPC y también en fantasmas de eritrocitos. Estos compuestos se adsorben preferencialmente en la interfase membrana lipídica/medio acuoso posiblemente por interacciones electroestáticas entre el grupo carboxilato del AHC y la cabeza polar de las membranas, no habiendo diferencias significativas en el reparto membrana lipídica/medio acuoso de los AHC entre sí. La reactividad frente al radical hidroxilo, generado por fotólisis del peróxido de hidrógeno, tanto en medio homogéneo como en medio microheterogéneo, se puede ordenar como $\text{AC7} < \text{AC1} < \text{AC5} \ll \text{AC3}$. Este orden de reactividades se mantuvo independiente del tipo de cabeza polar del fosfolípido y de la presencia o ausencia de insaturaciones en la cadena hidrocarbonada, sugiriendo que la reacción con el radical hidroxilo ocurre principalmente en la interfase.

En los ensayos de AAC, los derivados de AHC mostraron actividad antioxidante de menor a mayor: $\text{AC1} < \text{AC7} < \text{AC13} < \text{AC3} \sim \text{AC5}$, la cual es coincidente con la tendencia obtenida en los ensayos de oxidación de membranas de eritrocitos por el radical hidroxilo. Estos resultados dan cuenta que los ensayos en medio homogéneo no abarcan la complejidad de interacciones existentes entre los AHC y los medios celulares, sin embargo permiten explicar ciertos comportamientos.

Estos cuatro compuestos, junto con AC13, presentan propiedades antioxidantes frente al radical hidroxilo cuando es generado por medio de la reacción de Fenton en una proporción $[\text{Fe(II)}]/[\text{AHC}] = 1,0$; pudiendo deberse a sus propiedades de *scavenger* del radical hidroxilo o como agente quelante del ion ferroso, lo cual

merma sus propiedades como catalizador de la reacción. A mayores concentraciones de hierro (II), todos los compuestos siguen presentando propiedades antioxidantes, a excepción de los compuestos AC1 y AC5, que presentan el grupo catecol, que favorece la quelación del Fe(III) y permite favorecer la vía de reciclaje redox que exacerbaría la concentración de radicales hidroxilos en el sistema.

Todos los compuestos estudiados mostraron actividad antioxidante en células HL60 a 100 μM luego de 1 hora de incubación. Mientras que a concentraciones de 1 y 10 μM no se observa cambio significativo para AC7 y AC13, y un aumento en la producción de ROS cuando se empleó AC1, AC3 y AC5; sin embargo, este comportamiento no permite dilucidar que el comportamiento pro-oxidante de los AHC sea un factor citotóxico en células leucémicas HL-60.

8 Anexos.

Anexo 1. Caracterización fisicoquímica de los AHC: espectroscopía UV-vis, parámetros de cromatografía HPLC-DAD, lipofilia y pKa.

Caracterización mediante espectrofotometría UV-visible.

La caracterización espectrofotométrica se realizó en un equipo Agilent modelo 8453, en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Se empleó como solventes agua destilada, buffer fosfato 0,1 M (pH 7,4) y metanol. Se realizaron curvas de calibración con concentraciones crecientes de cada compuesto a partir de una solución stock en metanol, en un rango de 25 – 250 µM en celda. La determinación del coeficiente de extinción molar se realizó a una longitud de onda específica para cada compuesto en cada solvente, empleando la ecuación de Beer (**Ecuación 20**) en el rango lineal de la curva de calibración. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado.

$$A(\lambda) = b \times C \times \varepsilon(\lambda) \quad \text{(Ecuación 20)}$$

Donde $A(\lambda)$ es la absorbancia a una longitud λ de un pico de absorbancia determinado. b es el paso óptico de la celda de cuarzo. C es la concentración en celda del analito. $\varepsilon(\lambda)$ es el coeficiente de extinción molar a la longitud de onda λ .

Los espectros de absorción electrónica fueron medidos en el rango de 200-450 nm y a concentraciones crecientes de compuesto. En cada caso se sustrajo el espectro correspondiente al solvente puro (blanco). Los ensayos se realizaron en metanol, agua y buffer fosfato 0,1 M (pH 7,4).

Las bandas de absorción (**Tabla XIII**) más importantes del ácido cafeico (AC1) en agua destilada (constante dieléctrica 80,1) son una banda doble a los 290

y 315 nm, y otra banda localizada a los 216 nm (**Figura 47**). En tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) (constante dieléctrica 78,3), la banda doble aparece a 285 y 310 nm y una banda simple a 215 nm; mientras que en metanol (constante dieléctrica 32,7) la banda doble aparece a 297 y 325 nm, y la banda simple a 227 nm. El corrimiento batocrómico que se produce en las bandas de absorción cuando el solvente es metanol es producto de la menor estabilización del grupo cromóforo (carbonilo), debido a que el metanol es peor donador de puentes de hidrógeno que el agua. La tendencia fueron bandas de mayor intensidad y mayor longitud de onda máxima en metanol que en agua y buffer fosfato.

En el caso de los compuestos AC3, la presencia del grupo auxocrómico 5'-OH, desplaza las bandas de absorción presentes en el compuesto AC1 a mayores longitudes de onda (corrimiento batocrómico), en todos los solventes por igual; y además, aumenta la intensidad de la banda (efecto hipercrómico). El mismo efecto se observa entre AC2 y los compuestos AC4 y AC6, que sustituyen con los grupos Br- y Ph-, respectivamente.

El efecto del desplazamiento en la banda de absorción que provoca las sustituciones en para del anillo 5-fenilo en el ácido ferúlico (AC6) es dependiente del sustituyente y su efecto electrónico, es así como los compuestos AC7, 8, 9 y 12, cuyas sustituciones son grupos electrodonadores provocan corrimientos batocrómicos; mientras que los compuestos AC10 y 11 que poseen sustituyentes electroattractores generan corrimientos hipsocrómicos. La magnitud del desplazamiento es dependiente de la fuerza electro-donora o electro-atractora del grupo sustituyente.

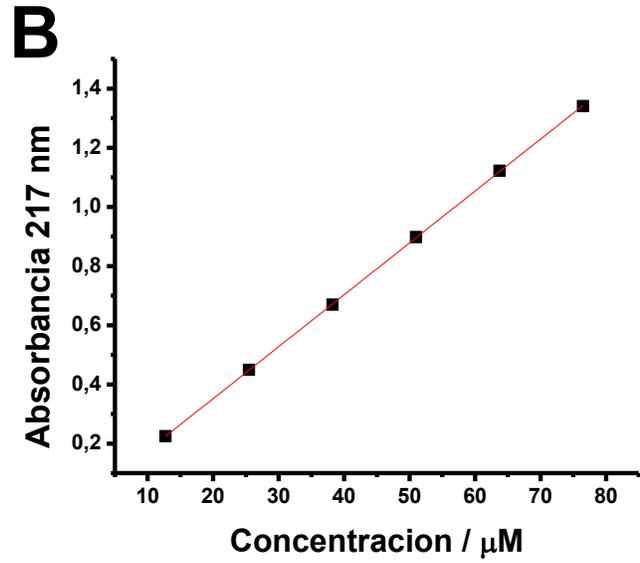
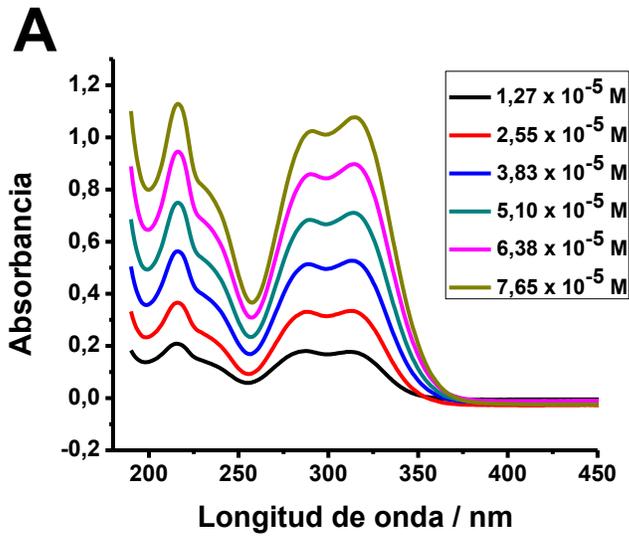


Figura 47 (A) Espectro UV de AC1 a distintas concentraciones en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4. (B) Curva de calibrado de AC1 a 217 nm en tampón (Regresión lineal: $y = 17540x, r^2 = 0,9999$).

Tabla XIII. Coeficientes de extinción molar en Agua, tampón fosfato 0,1 m pH 7,4 y metanol para cada compuesto.

Compuesto	Solvente	Coeficiente de extinción molar / $L\ mol^{-1}\ cm^{-1}$	Longitud de onda / nm
AC1	Agua	14616 ± 148	216
	Tampón	17540 ± 171	217
	Metanol	17699 ± 269	218
AC2	Agua	15833 ± 199	215
	Tampón	14384 ± 67	216
	Metanol	14837 ± 172	216
AC3	Agua	1555 ± 13	227
	Tampón	1343 ± 24	225
	Metanol	1615 ± 7	230
AC4	Agua	2555 ± 101	224
	Tampón	2027 ± 36	224
	Metanol	2690 ± 84	224
AC5	Agua	2423 ± 18	247
	Tampón	2424 ± 88	247
	Metanol	2634 ± 6	252
AC6	Agua	2423 ± 18	247

	Tampón	3153 ± 52	249
	Metanol	2805 ± 17	253
AC7	Agua	2493 ± 2	267
	Tampón	2464 ± 16	267
	Metanol	2786 ± 30	267
AC8	Agua	1917 ± 16	265
	Tampón	1975 ± 18	265
	Metanol	2037 ± 34	268
AC9	Agua	1871 ± 10	256
	Tampón	1844 ± 2	256
	Metanol	2073 ± 40	262
AC10	Agua	1916 ± 30	234
	Tampón	2103 ± 25	240
	Metanol	2183 ± 12	251
AC11	Agua	2330 ± 15	225
	Tampón	2166 ± 24	225
	Metanol	2412 ± 2	225
AC12	Agua	1119 ± 17	254
	Tampón	1085 ± 10	253
	Metanol	1151 ± 12	258

Lipofilia y pKa

La lipofilia, generalmente expresada como el logaritmo del coeficiente de partición n-octanol/agua, logP o logK_{ow}, constituye una propiedad fisicoquímica de suma importancia en la química medicinal. Juega un rol esencial en las características de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de drogas; además de influir en sus perfiles de toxicología y farmacodinamia, tales como la unión a proteínas plasmáticas, acumulación en tejidos o mecanismos de toxicidad [31]. Para compuestos ionizables, se emplea además el logaritmo del coeficiente de distribución, logD, pues toma en cuenta la dependencia del pH en el reparto entre fases.

Los coeficientes de partición (P) se obtienen según el reparto del compuesto estudiado entre n-octanol y agua; mientras que el coeficiente de distribución (D) se obtiene según el reparto entre n-octanol y tampón fosfato (0,1M pH 7,4).

Los compuestos derivados de ácido 5-fenilferúlico (AC6) se pueden ordenar de mayor a menor lipofilia: AC9 (4'-Cl) > AC12 (4'-CH₃) > AC10 (4'-F) > AC6 (4'-H) > AC11 (4'-NO₂) > AC8 (4'-OCH₃) > AC7 (3',4'-diOCH₃). Observándose que los grupos halogenados (cloro y fluoro), así como el grupo metilo, aumentan la lipofilia en comparación con AC6. Y los grupos nitro y metoxilos disminuyen la lipofilia de AC6.

Los demás compuestos se ordenan de mayor a menor lipofilia: AC4 (4-Br) > AC5 (4-Ph) > AC2 (ácido ferúlico) > AC1 (ácido cafeico) > AC3 (4-OH). Observándose que la presencia del grupo bromo y fenilo aumentan la lipofilia de AC1. La sustitución de 3-OH por 3-OCH₃, es otro cambio estructural que aumenta la lipofilia de AC1, debido a que el grupo metoxilo es un peor aceptor de puentes de hidrógenos que el grupo hidroxilo, y además no puede actuar como donador de puentes de hidrógeno. La presencia de un tercer grupo hidroxilo (anillo pirogalol)

(AC3) disminuye la lipofilia de AC1, debido a la mayor presencia de grupos polares con capacidad de interactuar favorablemente con el solvente.

En la serie estudiada, todos los compuestos tienen al menos dos grupos potencialmente ionizables en medio acuoso, el grupo carboxílico y el grupo hidroxilo en posición 4 del anillo bencénico. El grupo ácido carboxílico α,β -insaturado posee un pKa entre 3-4, por lo que a pH fisiológico (7,4) se encuentra completamente en la forma de anión carboxilato. Por otro lado, el grupo hidroxilo es más afectado por la naturaleza de los sustituyentes próximos. Observándose que la tendencia es pKa \sim 8,4-9,0 (**Tabla XIV**), valor característico de los alcoholes fenólicos. Observándose que el menor pKa corresponde a AC4 que posee un grupo electroattractor vecino al hidroxilo, y AC3 que posee dos grupos hidroxilos vecinos al centro de reacción, factor que ayuda a la estabilización del anión formado. Por otro lado, el mayor pKa lo posee AC2 que posee un grupo electrodonor vecino al centro de reacción. Los compuestos con un anillo fenilo sustituido, disminuyen el pKa comparándolo con AC2; sin embargo, entre ellos la variabilidad no es significativa.

Tabla XIV. Tiempo de retención en minutos, logaritmo de la constante de retención ($\log k'$), logaritmo de la constante de reparto n-octanol/agua ($\log P$), logaritmo de la constante de distribución n-octanol/tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) ($\log D$) y pKa, de cada compuesto.

Compuesto	Tiempo de retención / min	$\log k'$	$\log P$	$\log D$	pKa*
AC1	4,83	-0,26	0,42	-1,41	9,23
AC2	5,52	-0,15	0,93	-1,41	9,74
AC3	4,66	-0,35	-0,21	-1,40	8,92
AC4	22,91	-0,26	1,26	0,21	8,41
AC5	10,34	-0,18	1,16	-0,62	9,17
AC6	18,21	-0,08	1,53	-0,62	9,54
AC7	10,11	-0,17	0,88	-1,11	9,39
AC8	10,21	-0,18	1,16	-0,91	9,47
AC9	26,31	-0,06	2,21	0,90	9,30
AC10	26,12	-0,09	1,74	-0,07	9,20
AC11	18,48	-0,06	1,67	-0,02	8,88
AC12	26,18	-0,06	1,96	0,20	9,14

*El pKa fue calculado mediante la **ecuación 6**.

Entre la constante de partición ($\log P$) y la constante de capacidad ($\log k'$) se obtiene una relación lineal (**Figura 48**), cuya ecuación es $\log P = 0,1339 \times \log k' - 0,3040$ ($r^2=0,92$; $n=12$), indicando que existe una relación directa entre el factor de retención de cada compuesto y la lipofilia. Entre las demás variables no se observa algún tipo de relación con claridad.

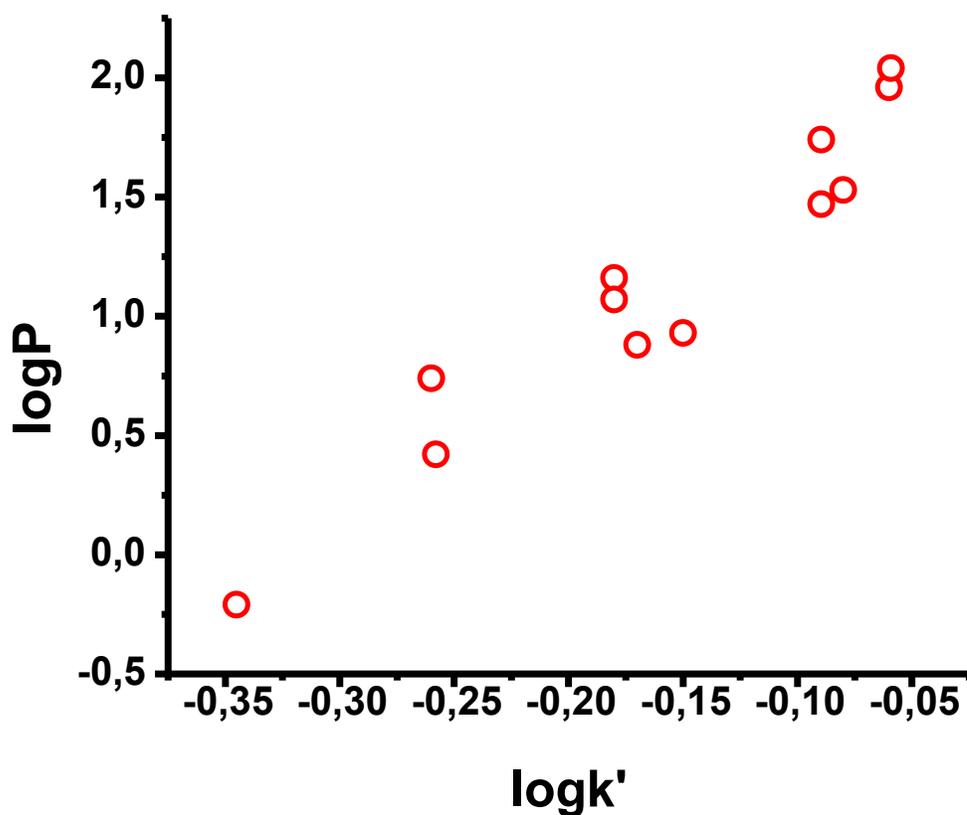


Figura 48 Gráfico entre el logaritmo del coeficiente de reparto *n*-octanol/agua ($\log P$) y el logaritmo del coeficiente de retención ($\log k'$) para todos los compuestos.

Anexo 2. Capacidad reductora de los AHC frente hierro (III) en medio ácido.

El poder reductor de los derivados de AHC frente al hierro se determinó mediante la metodología descrita por Tian [130] y Maurya [131]. Brevemente, 0,4 mL de diferentes concentraciones de AHC se añadieron a 0,4 mL de ferricianuro de potasio 1% y la muestra fue incubada a 50 °C por 20 min. 0,5 mL del sobrenadante se mezcló con 0,1 % de FeCl₃ y se midió la absorbancia a 700 nm. Una mayor absorbancia indica un mayor poder reductor.

$$Poder\ reductor = \left(\frac{A_{Muestra}}{A_{blanco}} - 1 \right) \times 100$$

En este ensayo se observa que el AHC que tiene el mayor poder reductor frente al ion férrico es el ácido cafeico (AC1) (Figura 47) y es dependiente de la concentración de AC1; resultado que concuerda con los obtenidos a pH 7,4 en los ensayos de *spin-trapping* en presencia de Fe⁺³. Esto es debido a la capacidad quelante del ácido cafeico frente al ion Fe⁺³, y posterior reducción a ion ferroso (Fe⁺²). Para los compuestos AC3 y AC5, que poseen potenciales de oxidación bajos (0,103 V y 0,28 V, respectivamente), la baja capacidad quelante frente al ion férrico impide que pueda reducir a este ion. Los compuestos derivados de ácido ferúlico (AC2, AC4, AC6-AC12), tienen menor capacidad quelante debido al impedimento estérico ejercido por el grupo 3-OCH₃, lo cual se traduce en menor capacidad reductora.

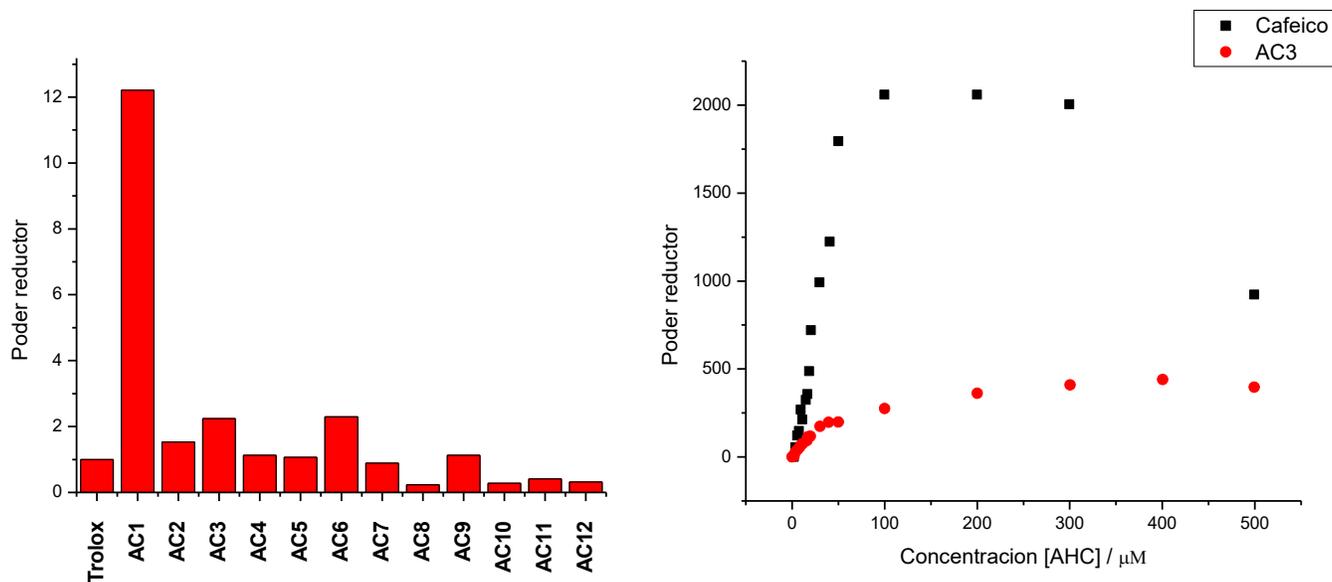


Figura 49 (Izquierda) Histograma del poder reductor de cada compuesto derivado de AHC cuyo valor es normalizado por una solución control (ausencia de AHC). (Derecha) Gráfico del poder reductor normalizado con respecto a la solución control de los compuestos AC1 y AC3 a concentraciones crecientes desde 0 (solución control) a 500 μM .

Anexo 3. Mediciones de tamaño promedio y potencial zeta.

El tamaño de partícula promedio y la carga se midieron mediante un *zeta potential analyzer* (Malvern ZetasizerNano ZS90, Malvern, UK). Las muestras fueron diluidas en tampón fosfato pH 7,4 antes de las mediciones de las propiedades superficiales. El tamaño de partícula promedio y la polidispersidad fueron determinados por triplicado. La concentración de los liposomas fue de 0,5 mM y los AHC se incorporaron a concentraciones de 1 y 10 μM .

Los tamaños de los liposomas de DPPC sintetizados por extrusión tuvieron un diámetro promedio de 174 ± 4 nm y un potencial zeta de -68 ± 1 mV. No se observaron diferencias significativas en tamaño y potencial zeta al incorporar los AHC en el rango de concentraciones empleados en los estudios de medio microheterogéneo.

9. Referencias

1. Uttara, B., et al., *Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options*. *Curr Neuropharmacol*, 2009. **7**(1): p. 65-74.
2. Li, J., et al., *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013. **14**(12): p. 24438-24475.
3. Edrey, Y.H. and A.B. Salmon, *Revisiting an age-old question regarding oxidative stress*. *Free Radic Biol Med*, 2014. **71**: p. 368-78.
4. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. **39**(1): p. 44-84.
5. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *The definition and measurement of antioxidants in biological systems*, in *Free Radic Biol Med*. 1995: United states. p. 125-6.
6. Nordberg, J. and E.S. Arner, *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system*. *Free Radic Biol Med*, 2001. **31**(11): p. 1287-312.
7. Lu, J.M., et al., *Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems*. *J Cell Mol Med*, 2010. **14**(4): p. 840-60.
8. Agati, G., et al., *Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance*. *Plant Sci*, 2012. **196**: p. 67-76.

9. Visioli, F., et al., *Polyphenols and human health: a prospectus*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2011. **51**(6): p. 524-46.
10. Seifried, H.E., et al., *A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species*. J Nutr Biochem, 2007. **18**(9): p. 567-79.
11. Olmstead, M.L., R.G. Hamilton, and R.S. Nicholson, *Theory of cyclic voltammetry for a dimerization reaction initiated electrochemically*. Analytical Chemistry, 1969. **41**(2): p. 260-267.
12. Manach, C., et al., *Polyphenols: food sources and bioavailability*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(5): p. 727-47.
13. Herrmann, K., *Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods*. Crit Rev Food Sci Nutr, 1989. **28**(4): p. 315-47.
14. Marmet, C., et al., *Quantification of phenolic acids and their methylates, glucuronides, sulfates and lactones metabolites in human plasma by LC–MS/MS after oral ingestion of soluble coffee*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014. **88**: p. 617-625.
15. Lara-Guzmán, O.J., et al., *GC/MS method to quantify bioavailable phenolic compounds and antioxidant capacity determination of plasma after acute coffee consumption in human volunteers*. Food Research International.
16. Konishi, Y., Z. Zhao, and M. Shimizu, *Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(20): p. 7539-43.

17. Zhao, Z., Y. Egashira, and H. Sanada, *Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver*. J Nutr, 2004. **134**(11): p. 3083-8.
18. Andreasen, M.F., et al., *Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(11): p. 5679-84.
19. Olthof, M.R., P.C. Hollman, and M.B. Katan, *Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans*. J Nutr, 2001. **131**(1): p. 66-71.
20. Poquet, L., M.N. Clifford, and G. Williamson, *Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(1): p. 190-7.
21. Stalmach, A., et al., *Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: identification of biomarkers of coffee consumption*. Drug Metab Dispos, 2009. **37**(8): p. 1749-58.
22. Renouf, M., et al., *Measurement of caffeic and ferulic acid equivalents in plasma after coffee consumption: small intestine and colon are key sites for coffee metabolism*. Mol Nutr Food Res, 2010. **54**(6): p. 760-6.
23. Litwinienko, G. and K.U. Ingold, *Solvent Effects on the Rates and Mechanisms of Reaction of Phenols with Free Radicals*. Accounts of Chemical Research, 2007. **40**(3): p. 222-230.
24. Wright, J.S., E.R. Johnson, and G.A. DiLabio, *Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(6): p. 1173-83.

25. Zhang, H.Y., Y.M. Sun, and X.L. Wang, *Substituent effects on O--H bond dissociation enthalpies and ionization potentials of catechols: a DFT study and its implications in the rational design of phenolic antioxidants and elucidation of structure-activity relationships for flavonoid antioxidants*. Chemistry, 2003. **9**(2): p. 502-8.
26. Roleira, F.M., et al., *Lipophilic phenolic antioxidants: correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties*. Bioorg Med Chem, 2010. **18**(16): p. 5816-25.
27. Hotta, H., et al., *Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2002. **1572**(1): p. 123-132.
28. Sakihama, Y., et al., *Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants*. Toxicology, 2002. **177**(1): p. 67-80.
29. Ordoudi, S.A., et al., *Structure-DPPH* scavenging activity relationships: parallel study of catechol and guaiacol acid derivatives*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(16): p. 5763-8.
30. Kanski, J., et al., *Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002. **13**(5): p. 273-281.
31. Trombino, S., et al., *Antioxidant Effect of Ferulic Acid in Isolated Membranes and Intact Cells: Synergistic Interactions with α -Tocopherol, β -Carotene, and Ascorbic Acid*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(8): p. 2411-2420.

32. Wang, X. and P.J. Quinn, *The location and function of vitamin E in membranes (review)*. Mol Membr Biol, 2000. **17**(3): p. 143-56.
33. Karmowski, J., et al., *Interactions between lipophilic antioxidants measured by photochemiluminescence assay and α -tocopherol equivalent antioxidant capacity assay as well as the influence of matrix compounds on the lipophilic antioxidant capacity*. LWT - Food Science and Technology, 2015. **64**(2): p. 817-823.
34. Sengupta, B., A. Banerjee, and P.K. Sengupta, *Investigations on the binding and antioxidant properties of the plant flavonoid fisetin in model biomembranes*. FEBS Letters, 2004. **570**(1–3): p. 77-81.
35. Chaudhuri, S., et al., *Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects*. International Journal of Biological Macromolecules, 2007. **41**(1): p. 42-48.
36. Hotta, H., et al., *Mechanistic study of the oxidation of caffeic acid by digital simulation of cyclic voltammograms*. Anal Biochem, 2002. **303**(1): p. 66-72.
37. Trabelsi, S.K., et al., *Electrochemical oxidation of ferulic acid in aqueous solutions at gold oxide and lead dioxide electrodes*. Journal of Applied Electrochemistry, 2005. **35**(10): p. 967-973.
38. Dorta, E., et al., *Role of alkoxy radicals on the fluorescein-based ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) assay*. Free Radic Biol Med, 2014. **75 Suppl 1**: p. S38.
39. De Gier, J., J.G. Mandersloot, and L.L.M. Van Deenen, *Lipid composition and permeability of liposomes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1968. **150**(4): p. 666-675.

40. Garrido, J., et al., *Alkyl esters of hydroxycinnamic acids with improved antioxidant activity and lipophilicity protect PC12 cells against oxidative stress*. *Biochimie*, 2012. **94**(4): p. 961-967.
41. Bickers, D.R. and M. Athar, *Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2006. **126**(12): p. 2565-2575.
42. Amić, A., et al., *Towards an improved prediction of the free radical scavenging potency of flavonoids: The significance of double PCET mechanisms*. *Food Chemistry*, 2014. **152**: p. 578-585.
43. Mladěnka, P., et al., *In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2011. **105**(5): p. 693-701.
44. Deligiannakis, Y., G.A. Sotiriou, and S.E. Pratsinis, *Antioxidant and antiradical SiO₂ nanoparticles covalently functionalized with gallic acid*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2012. **4**(12): p. 6609-17.
45. Vergara-Castañeda, H., et al., *Quercetin conjugated silica particles as novel biofunctional hybrid materials for biological applications*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2016. **466**: p. 44-55.
46. Liu, W. and R. Guo, *Effects of Triton X-100 nanoaggregates on dimerization and antioxidant activity of morin*. *Mol Pharm*, 2008. **5**(4): p. 588-97.
47. Darr, D. and I. Fridovich, *Free radicals in cutaneous biology*. *J Invest Dermatol*, 1994. **102**(5): p. 671-5.
48. Zhou, Q., et al., *Studies on the interaction of interface between morin and TiO₂*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009. **72**(1): p. 110-114.

49. Shetty, P.K., et al., *Development and evaluation of sunscreen creams containing morin-encapsulated nanoparticles for enhanced UV radiation protection and antioxidant activity*. International Journal of Nanomedicine, 2015. **10**: p. 6477-6491.
50. Goldstein, S., et al., *Photolysis of Aqueous H₂O₂: Quantum Yield and Applications for Polychromatic UV Actinometry in Photoreactors*. Environmental Science & Technology, 2007. **41**(21): p. 7486-7490.
51. Finkelstein, E., G.M. Rosen, and E.J. Rauckman, *Spin trapping. Kinetics of the reaction of superoxide and hydroxyl radicals with nitrones*. Journal of the American Chemical Society, 1980. **102**(15): p. 4994-4999.
52. Saleemuddin, M., U. Zimmermann, and F. Schneeweiss, *Preparation of human erythrocyte ghosts in isotonic solution: haemoglobin content and polypeptide composition*. Z Naturforsch C, 1977. **32**(7-8): p. 627-31.
53. Akoev, V.R., et al., *The effect of oxidative stress on structural transitions of human erythrocyte ghost membranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1998. **1371**(2): p. 284-294.
54. Miki, M., et al., *Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by α -tocopherol*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1987. **258**(2): p. 373-380.
55. Ye, S., et al., *Polyunsaturated docosahexaenoic acid suppresses oxidative stress induced endothelial cell calcium influx by altering lipid composition in membrane caveolar rafts*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2010. **83**(1): p. 37-43.
56. Valujskikh, A. and P.S. Heeger, *Emerging roles of endothelial cells in transplant rejection*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(5): p. 493-8.

57. Beretta, G., M. Orioli, and R.M. Facino, *Antioxidant and radical scavenging activity of honey in endothelial cell cultures (EA.hy926)*. *Planta Med*, 2007. **73**(11): p. 1182-9.
58. Aldini, G., et al., *Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection*. *Life Sci*, 2003. **73**(22): p. 2883-98.
59. Fresco, P., et al., *New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols*. *Med Res Rev*, 2006. **26**(6): p. 747-66.
60. Fresco, P., et al., *The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis*. *Curr Pharm Des*, 2010. **16**(1): p. 114-34.
61. Ramos, S., *Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways*. *Mol Nutr Food Res*, 2008. **52**(5): p. 507-26.
62. Chen, J.-H., et al., *Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells*. *Cancer Letters*, 1996. **108**(2): p. 211-214.
63. Michaluart, P., et al., *Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation*. *Cancer Res*, 1999. **59**(10): p. 2347-52.
64. Chen, Y.-J., et al., *Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Antioxidant from Propolis, on Inducing Apoptosis in Human Leukemic HL-60 Cells*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49**(11): p. 5615-5619.
65. Kolberg, M., et al., *Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2004. **1699**(1-2): p. 1-34.

66. Aisen, P., *Transferrin receptor 1*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(11): p. 2137-43.
67. Heath, L.J., et al., *Iron Deprivation in Cancer—Potential Therapeutic Implications*. Nutrients, 2013. **5**(8).
68. Corcé, V., et al., *Recent advances in cancer treatment by iron chelators*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016. **26**(2): p. 251-256.
69. Ihnat, P.M., J.L. Vennerstrom, and D.H. Robinson, *Solution equilibria of deferoxamine amides*. J Pharm Sci, 2002. **91**(7): p. 1733-41.
70. Gazitt, Y., et al., *A new molecular role for iron in regulation of cell cycling and differentiation of HL-60 human leukemia cells: iron is required for transcription of p21(WAF1/CIP1) in cells induced by phorbol myristate acetate*. J Cell Physiol, 2001. **187**(1): p. 124-35.
71. Khan, A.U.H., et al., *Human Leukemic Cells performing Oxidative Phosphorylation (OXPHOS) Generate an Antioxidant Response Independently of Reactive Oxygen species (ROS) Production*. EBioMedicine, 2016. **3**: p. 43-53.
72. Blasco, A.J., et al., *Direct Electrochemical Sensing and Detection of Natural Antioxidants and Antioxidant Capacity in Vitro Systems*. Electroanalysis, 2007. **19**(22): p. 2275-2286.
73. Climent, V. and J.M. Feliu, *Cyclic Voltammetry*, in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. 2015, Elsevier.
74. Nicholson, R.S. and I. Shain, *Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems*. Analytical Chemistry, 1964. **36**(4): p. 706-723.

75. Faulkner, L.R., *Electrochemical Characterization of Chemical Systems A2 - KUWANA, THEODORE*, in *Physical Methods in Modern Chemical Analysis*. 1983, Academic Press. p. 137-248.
76. Eklund, J.C., et al., *Perspectives in Modern Voltammetry: Basic Concepts and Mechanistic Analysis*, in *Advances in Physical Organic Chemistry*, D. Bethell, Editor. 1999, Academic Press. p. 1-120.
77. Cheesman, M.R., *Electron paramagnetic resonance. Elementary theory and practical applications: By John A. Weil, James R. Bolton and John E. Wertz. Wiley, Chichester (1994). 568 pp. Price £66.00. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1995. **51**(6): p. 1084.
78. F.H, *Introduction to magnetic resonance, with applications to chemistry and chemical physics*. Journal of Molecular Structure, 1974. **22**(3): p. 473-474.
79. Matos, M.J., et al., *Remarkable antioxidant properties of a series of hydroxy-3-arylcoumarins*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013. **21**(13): p. 3900-3906.
80. Sjöback, R., J. Nygren, and M. Kubista, *Absorption and fluorescence properties of fluorescein*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1995. **51**(6): p. L7-L21.
81. López-Alarcón, C. and A. Denicola, *Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays*. Analytica Chimica Acta, 2013. **763**: p. 1-10.
82. Scherrer, R.A. and S.M. Howard, *Use of distribution coefficients in quantitative structure-activity relationships*. J Med Chem, 1977. **20**(1): p. 53-8.

83. Corcé, V., et al., *Recent advances in cancer treatment by iron chelators*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016. **26**(2): p. 251-256.
84. Laouini, A., et al., *Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art*. Journal of Colloid Science and Biotechnology, 2012. **1**(2): p. 147-168.
85. Liu, W., A. Ye, and H. Singh, *Chapter 8 - Progress in Applications of Liposomes in Food Systems A2 - Sagis, Leonard M.C*, in *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*. 2015, Academic Press: San Diego. p. 151-170.
86. Gómez-Hens, A. and J. Manuel Fernández-Romero, *The role of liposomes in analytical processes*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2005. **24**(1): p. 9-19.
87. Martin, I., et al., *Influence of the target molecule on the oxygen radical absorbance capacity index: a comparison between alizarin red- and fluorescein-based methodologies*. J Med Food, 2009. **12**(6): p. 1386-92.
88. Pauletti, G.M. and H. Wunderli-Allenspach, *Partition coefficients in vitro: artificial membranes as a standardized distribution model*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 1994. **1**(5): p. 273-282.
89. Escher, B.I. and R.P. Schwarzenbach, *Partitioning of Substituted Phenols in Liposome-Water, Biomembrane-Water, and Octanol-Water Systems*. Environmental Science & Technology, 1996. **30**(1): p. 260-270.
90. Pignatello, R., et al., *Biomembrane models and drug-biomembrane interaction studies: Involvement in drug design and development*. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 2011. **3**(1): p. 4-14.

91. Escher, B.I., R.P. Schwarzenbach, and J.C. Westall, *Evaluation of Liposome–Water Partitioning of Organic Acids and Bases. 1. Development of a Sorption Model*. Environmental Science & Technology, 2000. **34**(18): p. 3954-3961.
92. Abuin, E.B. and E.A. Lissi, *Substrate partitioning and chemical equilibrium in a micellar solution*. Journal of Chemical Education, 1992. **69**(4): p. 340.
93. de Castro, B., et al., *A fast and reliable spectroscopic method for the determination of membrane--water partition coefficients of organic compounds*. Lipids, 2001. **36**(1): p. 89-96.
94. Omran, A.A., et al., *Determination of partition coefficients of diazepam and flurazepam between phosphatidylcholine bilayer vesicles and water by second derivative spectrophotometric method*. J Pharm Biomed Anal, 2001. **25**(2): p. 319-24.
95. Rodrigues, C., et al., *Spectrophotometric determination of drug partition coefficients in dimyristoyl-l- α -phosphatidylcholine/water: a comparative study using phase separation and liposome suspensions*. Analytica Chimica Acta, 2001. **428**(1): p. 103-109.
96. Kitamura, K., T. Goto, and T. Kitade, *Second derivative spectrophotometric determination of partition coefficients of phenothiazine derivatives between human erythrocyte ghost membranes and water*. Talanta, 1998. **46**(6): p. 1433-1438.
97. Rodrigues, C., et al., *Derivative spectrophotometry as a tool for the determination of drug partition coefficients in water/dimyristoyl-l- α -phosphatidylglycerol (DMPG) liposomes*. Biophysical Chemistry, 2001. **94**(1–2): p. 97-106.

98. Santos, N.C., M. Prieto, and M.A.R.B. Castanho, *Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2003. **1612**(2): p. 123-135.
99. Nash, G.B. and H.J. Meiselman, *Effects of preparative procedures on the volume and content of resealed red cell ghosts*. *Biochim Biophys Acta*, 1985. **815**(3): p. 477-85.
100. Schwach, G. and H. Passow, *Preparation and properties of human erythrocyte ghosts*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1973. **2**(2): p. 197-218.
101. Čavar, S., F. Kovač, and M. Maksimović, *Synthesis and antioxidant activity of selected 4-methylcoumarins*. *Food Chemistry*, 2009. **117**(1): p. 135-142.
102. Lopez-Alarcon, C. and E. Lissi, *A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxy radicals*. *Free Radic Res*, 2006. **40**(9): p. 979-85.
103. Nasr, B., et al., *Electrochemical oxidation of hydroquinone, resorcinol, and catechol on boron-doped diamond anodes*. *Environ Sci Technol*, 2005. **39**(18): p. 7234-9.
104. Rodriguez, J., et al., *Comparative spectroscopic and electrochemical study of nitroindazoles: 3-alcoxy, 3-hydroxy and 3-oxo derivatives*. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2008. **70**(3): p. 557-63.
105. Perez-Cruz, F., et al., *Synthesis and electrochemical and biological studies of novel coumarin-chalcone hybrid compounds*. *J Med Chem*, 2013. **56**(15): p. 6136-45.

106. Wolfe, K.L. and R.H. Liu, *Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(22): p. 8896-907.
107. Wang, H. and J.A. Joseph, *Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader*¹. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **27**(5–6): p. 612-616.
108. Eruslanov, E. and S. Kusmartsev, *Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry*, in *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*. 2009. p. 57-72.
109. Vazquez-Rodriguez, S., et al., *Synthesis of coumarin-chalcone hybrids and evaluation of their antioxidant and trypanocidal properties*. MedChemComm, 2013. **4**(6): p. 993-1000.
110. Valkonen, M. and T. Kuusi, *Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum*. Journal of Lipid Research, 1997. **38**(4): p. 823-833.
111. Niki, E., *Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals*. Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 100-8.
112. Cathcart, R., E. Schwiers, and B.N. Ames, *Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay*. Analytical Biochemistry, 1983. **134**(1): p. 111-116.
113. Likussar, W. and D.F. Boltz, *Theory of continuous variations plots and a new method for spectrophotometric determination of extraction and formation constants*. Analytical Chemistry, 1971. **43**(10): p. 1265-1272.

114. Renny, J.S., et al., *Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry*[**]. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 2013. **52**(46): p. 11998-12013.
115. Kilmartin, P.A., H. Zou, and A.L. Waterhouse, *A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49**(4): p. 1957-1965.
116. Hapiot, P., et al., *Oxidation of caffeic acid and related hydroxycinnamic acids*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1996. **405**(1): p. 169-176.
117. Trabelsi, S.K., N.B. Tahar, and R. Abdelhedi, *Electrochemical behavior of caffeic acid*. *Electrochimica Acta*, 2004. **49**(9–10): p. 1647-1654.
118. Le Nest, G., et al., *Zn–polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: II Electrochemical and EPR studies*. *Inorganica Chimica Acta*, 2004. **357**(7): p. 2027-2037.
119. van Acker, S.A., et al., *A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids*. *Chem Res Toxicol*, 1996. **9**(8): p. 1305-12.
120. Kalyanaraman, B., C.C. Felix, and R.C. Sealy, *Semiquinone anion radicals of catechol(amine)s, catechol estrogens, and their metal ion complexes*. *Environ Health Perspect*, 1985. **64**: p. 185-98.
121. Kalyanaraman, B., *Characterization of o-semiquinone radicals in biological systems*. *Methods Enzymol*, 1990. **186**: p. 333-43.

122. Todorova, T.Z., et al., *Structure of flavones and flavonols. Part I: Role of substituents on the planarity of the system*. Computational and Theoretical Chemistry, 2013. **1017**: p. 85-90.
123. Beck, F., *Cyclic voltammetry—simulation and analysis of reaction mechanisms*. By David K. Gosser, Jr., VCH, New York 1993, xi, 154 pp., hardcover, DM 124.00, ISBN 3-527-28226-2, disks included (5 1/4" and 3 1/2"). Electroanalysis, 1995. **7**(3): p. 298-298.
124. Liu, W. and R. Guo, *Effects of Triton X-100 Nanoaggregates on Dimerization and Antioxidant Activity of Morin*. Molecular Pharmaceutics, 2008. **5**(4): p. 588-597.
125. Aguilera-Venegas, B., et al., *Indazoles: a new top seed structure in the search of efficient drugs against Trypanosoma cruzi*. Future Med Chem, 2013. **5**(15): p. 1843-59.
126. Lee, G.H., et al., *Antioxidative and antiinflammatory activities of quercetin-loaded silica nanoparticles*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.
127. Shaw, D.J., 1 - *The colloidal state*, in *Introduction to Colloid and Surface Chemistry (Fourth Edition)*. 1992, Butterworth-Heinemann: Oxford. p. 1-20.
128. Moridani, M.Y., et al., *Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers*. Free Radical Biology and Medicine, 2003. **34**(2): p. 243-253.
129. Hole, P.S., R.L. Darley, and A. Tonks, *Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias?* Blood, 2011. **117**(22): p. 5816.

130. Tian, B. and Y. Hua, *Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA*. Food Chemistry, 2005. **91**(3): p. 413-418.

131. Maurya, D.K. and T.P. Devasagayam, *Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids*. Food Chem Toxicol, 2010. **48**(12): p. 3369-73.