

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



*“Benzofuranonas derivadas de la oxidación  
de flavonoides: Evaluación de su potencial  
para generar nuevos antioxidantes”*

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
de Doctor en Ciencias Farmacéuticas por:

***María Fernanda Arias Santé***

Director de Tesis: Dr. Hernán Speisky.

Santiago-CHILE

Agosto 2023

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO**

**Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata**

**María Fernanda Arias Santé**

**Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Ciencias Farmacéuticas, en el examen público rendido el día**

**Director de Tesis:**

**Dr. Hernán Speisky** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Javier Morales V.** \_\_\_\_\_

**Dr. Alexis Aspee** \_\_\_\_\_

**Dr. Claudio Olea** \_\_\_\_\_

**Dr. Edgar Pastene** \_\_\_\_\_

***A Patricia Santé, Fernando Arias y María Saavedra***

## **Agradecimientos**

Luego de este largo camino en el doctorado, luego de haber atravesado momentos muy difíciles, un estallido social, una pandemia, y otras cosas, sólo quiero agradecer a las personas que me ayudaron a mantener mi ánimo y espíritu que me permitió llegar a obtención de mi grado de Doctor.

Si bien hay muchas cosas que en este proceso hubiese querido que fueran distintas y mejores, estoy profundamente agradecida por el crecimiento académico y profesional y más aún, por el gran crecimiento personal que me ha permitido obtener las experiencias adquiridas en este camino.

Primero, quiero agradecer a mis padres, Patricia y Fernando, mis principales anclas en este mundo, que con su infinito amor me dieron el sustento (en muchos aspectos) para poder darme la posibilidad de realizar este postgrado. También agradezco a una linda casualidad que en 2018 me lleva a conocer a Jorge U., mi pareja desde entonces, que ha sido un apoyo fundamental para sortear estos difíciles años.

Mi núcleo cercano de amigos y familiares de igual manera ha sido crucial para llegar a la culminación de esta etapa. Este trabajo va dedicado en particular a todas las mujeres de este entorno cercano que con sus vivencias me han dado la fuerza para perseguir mis sueños y no rendirme, especialmente a mi Abueli María, que, al recordar lo que fue su vida, me entregó la fuerza necesaria para poder concluir esta etapa, sobre todo en estos momentos finales. Agradezco profundamente a todo este núcleo cercano que siempre tuvo fé en mi (aún cuando yo misma no la tenía) y me motivo a despertar la resiliencia y seguir adelante a pesar de todo. Espero que mi experiencia en la obtención de este doctorado pueda motivar a mis pequeñas mujeres Tamy, Cony, Monse, Agus y Ellie a perseguir sus sueños contra viento y marea.

Gracias a mi paso por el Laboratorio de Antioxidantes del INTA me llevó a conocer a una persona que ha sido muy importante en mi desarrollo profesional

actual, que es el Dr. Adriano Costa de Camargo, que ha sido un gran mentor y apoyo.

Muchas gracias a la comisión evaluadora de mi tesis doctoral, que siempre generaron un entorno de confianza y respeto para compartir sus críticas constructivas que ayudaron a focalizar, direccionar y mejorar este trabajo.

Finalmente, no quiero dejar este texto sin destacar que esta etapa me puso a prueba en muchos sentidos, por momentos fue muy duro y casi insoportable, pero al final, me llevo para mí, lo orgullosa que me siento por siempre haber mantenido mis valores y ética intactos a pesar de las dificultades y siempre haber entregado lo mejor de mí.

## **Financiamiento**

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Antioxidantes del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile. El proyecto fue financiado por el proyecto FONDECYT Regular 1190053 (2019-2023) y la beca doctoral CONICYT 21180870 (2018-2021).

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>10</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
3.1. Objetivo general.....	11
3.2. Objetivos específicos.....	11
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
4.1. Reactivos.....	13
4.2. <u>Métodos relacionados con el objetivo específico 1</u> .....	13
4.2.1 Oxidación de flavonoides.....	13
4.3. <u>Métodos relacionados con el objetivo específico 2</u> .....	15
4.3.1 Condiciones de cultivo celular.....	15
4.3.2 Estrés oxidativo celular.....	16
4.3.3 Determinación de citotoxicidad y viabilidad celular.....	17
4.3.3.1 Reducción de MTT.....	17
4.3.3.2 Liberación de LDH.....	18
4.4. <u>Métodos relacionados con el objetivo específico 3</u> .....	19
4.4.1 Búsqueda, aislamiento e identificación de BZF en mezclas FLox.....	19
4.5. <u>Métodos relacionados con el objetivo específico 4</u> .....	21
4.5.1 Obtención de mezclas FLox libres de BZF mediante sustracción química y comparación de su actividad antioxidante celular con mezclas	

FLox completas.....	21
4.6. <u>Métodos relacionados con el objetivo específico 5 y 6</u> .....	24
4.6.1 Curva de calibración para Q-BZF y KAEM-BZF.....	24
4.6.2 Aislamiento de BZF para ensayos celulares y evaluación de la capacidad antioxidante y citoprotectora de estos metabolitos.....	26
4.7. <u>Métodos relacionados a experimentos complementarios</u> .....	29
4.7.1 Análisis por resonancia magnética nuclear de Q-BZF.....	29
4.7.2 Comparación de la activación de NF-kB por las BZF derivadas de quercetina (Q-BZF) y kaempferol (KAEM-BZF) y sus respectivos flavonoides precursores.....	30
4.8. <u>Análisis estadístico</u> .....	30
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>31</b>
5.1 <u>Resultados relacionados con el objetivo específico 1</u> .....	31
5.1.1 Oxidación de flavonoides.....	31
5.2 <u>Resultados relacionados con el objetivo específico 2</u> .....	36
5.2.1 Comparación de la capacidad antioxidante celular de mezclas FLox versus la de sus respectivos flavonoides de origen.....	36
5.3 <u>Resultados relacionados con el objetivo específico 3</u> .....	44
5.3.1 Búsqueda, aislamiento e identificación de BZF.....	44
5.4 <u>Resultados relacionados con el objetivo específico 4</u> .....	57
5.4.1 Desarrollo de mezclas FLox libres de BZF mediante sustracción química y comparación de su capacidad antioxidante celulares con las mezclas FLox completas.....	57
5.5 <u>Resultados relacionados con el objetivo específico 5 y 6</u> .....	68



5.5.1 Aislamiento de BZF para ensayos celulares y evaluación de su capacidad antioxidante.....	68
5.5.2 Comparación de la capacidad citoprotectora de BZF, FLox y flavonoides.....	81
5.5.3 Índices de amplificación antioxidante y relaciones estructura-actividad .....	88
5.6 <u>Resultados relacionados con experimentos complementarios</u> .....	97
5.6.1 Análisis por resonancia magnética nuclear de Q-BZF.....	97
5.6.2 Comparación de la actividad del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) por las BZF aisladas derivadas de quercetina (Q-BZF) y kaempferol (KAEM-BZF), con sus respectivos flavonoides precursores .....	98
<b>6. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>103</b>
<b>7. PRODUCTIVIDAD.....</b>	<b>107</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>109</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>121</b>
ANEXO I: Estructuras químicas de metabolitos originados tras la degradación de taxifolina .....	121
ANEXO II: Cromatogramas HPLC-ESI-MS/MS de las BZF aisladas .....	122
ANEXO III: Comparación de efectos antioxidantes de FLox versus BZF aisladas.....	127
ANEXO IV: Espectros RMN ( $^{13}\text{C}$ y $^1\text{H}$ ) de Q-BZF aislada .....	129

## ÍNDICE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Núcleo flavan; esqueleto 2-fenil-3,4-dihidro-2H-1-benzopirano, común a todos los flavonoides C6-C3-C6.....	2
<b>Figura 2:</b> Estructuras químicas de flavonoides en estudio.....	7
<b>Figura 3.</b> Estructuras químicas de las benzoil-benzofuranonas derivadas de flavonoides en estudio.....	9
<b>Figura 4.</b> Curvas de calibración para las BZF de quercetina y kaempferol.....	25
<b>Figura 5.</b> Degradación oxidativa tiempo-dependiente de flavonoides después de ser sometidos a un medio alcalino.....	32
<b>Figura 6.</b> Comparación de los efectos antioxidantes de los flavonoides miricetina, quercetina y fisetina con sus respectivas mezclas obtenidas tras la oxidación frente al aumento del estrés oxidativo intracelular inducido por indometacina a 325 $\mu$ M.....	37
<b>Figura 7.</b> Comparación de los efectos antioxidantes de los flavonoides dideoxiquercetina y taxifolina con sus respectivas mezclas obtenidas tras la oxidación frente al aumento del estrés oxidativo intracelular inducido por indometacina a 325 $\mu$ M.....	39
<b>Figura 8.</b> Comparación de los efectos antioxidantes de los flavonoides kaempferol, isoramnetina y morina con sus respectivas mezclas obtenidas tras la oxidación frente al aumento del estrés oxidativo intracelular inducido por	

indometacina a 325 $\mu$ M.....	41
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas resultantes del análisis HPLC-DAD de las mezclas oxidativas FLox.....	45
<b>Figura 10.</b> Cromatogramas resultantes del análisis HPLC-DAD de las mezclas oxidativas de los FLox TAXox y DDQox.....	48
<b>Figura 11.</b> Secuencia de estructuras químicas y reacciones propuestas que están involucradas en la conversión oxidativa de quercetina a Q-BZF.....	55
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas HPLC-DAD de las mezclas de oxidación de FLox cuando se elimina la BZF de su composición (FLox libre de BZF) y cromatogramas de las BZF aisladas.....	58
<b>Figura 13.</b> Comparación de la capacidad antioxidante de las mezclas de oxidación FLox cuando se elimina químicamente de su composición el peak asociado a la BZF.....	61
<b>Figura 14.</b> Efectos antioxidantes de concentraciones crecientes de BZF aisladas a partir de la oxidación de quercetina y kaempferol.....	71
<b>Figura 15.</b> Efectos antioxidantes de concentraciones equivalentes crecientes de BZF derivadas de la oxidación de los flavonoides miricetina, fisetina, isoramnetina y morina .....	73
<b>Figura 16.</b> Comparación de la capacidad de flavonoides, FLox y BZF aisladas en proteger a células Caco-2 contra el incremento en la liberación de LDH inducido	

por indometacina.....82

**Figura 17.** Comparación de la capacidad de flavonoides, FLox y BZF aisladas en proteger a células Caco-2 contra el decaimiento en la reducción de MTT inducido por indometacina.....86

**Figura 18.** Comparación de efectos en la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) inducido por indometacina en células Caco-2 por parte de KAEM-BZF y Q-BZF además de sus respectivos flavonoides de origen.....100

## ÍNDICE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Intervalo de tiempo de las fracciones realizadas para la sustracción química de cada BZF desde su respectivo FLox.....	22
<b>Tabla 2.</b> Áreas promedio detectadas por HPLC-DAD del peak asociado a la BZF dentro de cada FLox.....	27
<b>Tabla 3:</b> Concentraciones remanentes de las BZF aisladas reconstituidas en PBS obtenidas mediante HPLC-DAD luego de 2 horas de análisis .....	70
<b>Tabla 4:</b> Índices de amplificación antioxidante.....	88
<b>Tabla 5:</b> Propiedad fisicoquímicas de las BZF en estudio.....	94

## Abreviaturas

<b>-OH</b>	: Grupo hidroxilo
<b>ABC</b>	: Área bajo la curva detectada por HPLC-DAD
<b>ADME</b>	: Procesos que involucran las absorción, distribución, metabolismo y excreción de un compuesto al ser incorporado al organismo.
<b>AINE</b>	: Anti-inflamatorio no esteroideal
<b>AOX</b>	: Antioxidante
<b>BZF</b>	: Benzofuranona(s)
<b>CE<sub>80</sub></b>	: Concentración efectiva a la cual el tratamiento protege del 80% del daño inducido por ROS en células.
<b>DCHF</b>	: Diclorohidrofluoresceína
<b>DCHFD</b>	: Diclorohidrofluoresceína diacetato
<b>DDQ</b>	: Dideoxiquercetina
<b>DDQox</b>	: Mezcla de metabolitos generada tras la oxidación en medio alcalino de dideoxiquercetina, con una concentración de 2 a 4% del flavonoide en estudio.
<b>D.S.</b>	: Desviación estándar
<b>EO</b>	: Estrés oxidativo
<b>FIS</b>	: Fisetina
<b>FISox</b>	: Mezcla de metabolitos generada tras la oxidación en medio alcalino de fisetina, con una concentración de 2 a 4% del flavonoide en estudio.
<b>FIS-BZF</b>	: Benzofuranona derivada de la oxidación de fisetina. 2-(3,4-dihidroxibenzoil)-2,6-dihidroxi-3(2H)-benzofuranona.
<b>FL</b>	: Flavonoide
<b>FLox</b>	: Mezcla de metabolitos resultante de la oxidación de un flavonoide cuando esté esta entre 1-4% dentro de su composición.
<b>GSH</b>	: Glutación reducido
<b>HO-1</b>	: Hemo oxigenasa 1
<b>INDO</b>	: Indometacina
<b>INTA</b>	: Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile
<b>ISO</b>	: Isoramnetina
<b>ISORox</b>	: Mezcla de metabolitos generada tras la oxidación en medio alcalino de isoramnetina, con una concentración de 2 a 4% del flavonoide en estudio.
<b>ISO-BZF</b>	: Benzofuranona derivada de la oxidación de isoramnetina. 2-(3-metoxi,4- hidroxibenzoil)-2,4,6-trihidroxi-3(2H)-benzofuranona
<b>KAEM</b>	: Kaempferol
<b>KAEMox</b>	: Mezcla de metabolitos generada tras la oxidación en medio alcalino de kaempferol, con una concentración de 2 a 4% del flavonoide en estudio
<b>KAEM-BZF</b>	: Benzofuranona derivada de la oxidación de kaempferol. 2-(4-hidroxibenzoil)-2,4,6-trihidroxi-3(2H)-benzofuranona

<b>LDH</b>	: Lactato deshidrogenasa
<b>LogD</b>	: Coeficiente de distribución
<b>LogP</b>	: Coeficiente de partición
<b>m/z</b>	: Valor de relación masa/carga
<b>MOR</b>	: Morina
<b>MORox</b>	: Mezcla de metabolitos generada tras la oxidación en medio alcalino de morina, con una concentración de 2 a 4% del flavonoide en estudio
<b>MOR-BZF</b>	: Benzofuranona derivada de la oxidación de morina. 2-(2,4-dihidroxibenzoil)-2,4,6-trihidroxi-3(2H)-benzofuranona
<b>MTT</b>	: Sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazolium)
<b>MYR</b>	: Miricetina
<b>MYRox</b>	: Mezcla de metabolitos generada tras la oxidación en medio alcalino de miricetina, con una concentración de 2 a 4% del flavonoide en estudio
<b>MYR-BZF</b>	: Benzofuranona derivada de la oxidación de miricetina. 2-(3,4,5-trihidroxibenzoil)-2,4,6-trihidroxi-3(2H)-benzofuranona
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
<b>NQO-1</b>	: NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1
<b>Nrf2:</b>	: Factor nuclear eritroide similar al factor 2
<b>PBS</b>	: Tampón fosfato salino
<b>pKa</b>	: Magnitud de disociación de moléculas en medio acuoso.
<b>PKC</b>	: Proteína quinasa C
<b>PPO</b>	: Polifenol oxidasa
<b>ROS</b>	: Especies reactivas del oxígeno
<b>QUE</b>	: Quercetina
<b>Qox</b>	: Mezcla de metabolitos generada tras la oxidación en medio alcalino de quercetina, con una concentración de 2 a 4% del flavonoide en estudio
<b>Q-BZF</b>	: Benzofuranona derivada de la oxidación de quercetina. 2-(3,4-dihidroxibenzoil)-2,4,6-trihidroxi-3(2H)-benzofuranona
<b>TAX</b>	Taxifolina
<b>TAXox</b>	: Mezcla de metabolitos generada tras la oxidación en medio alcalino de taxifolina, con una concentración de 2 a 4% del flavonoide en estudio
<b>t<sub>R</sub></b>	: Tiempo de retención
<b>u.m.a</b>	: Unidades de masa atómica

## RESUMEN

Los flavonoides han atraído la atención de los químicos de alimentos y los investigadores biomédicos debido a su amplia presencia en plantas comestibles y su potencial para promover acciones en salud. Aunque los flavonoides pueden mostrar una amplia gama de bioactividades, su capacidad antioxidante, ya sea que se ejerza a través de una acción directa o indirecta de eliminación de ROS, o también por otros mecanismos enzimáticos, sigue siendo la bioactividad más destacada con la que están asociados estos compuestos. Dado que la oxidación de un flavonoide inducida por ROS involucra reacciones de transferencia de electrones/hidrógeno que inicialmente comprometen sus grupos fenólicos y, en última instancia, su esqueleto o núcleo flavan, se ha asumido durante mucho tiempo que la oxidación de un flavonoide implica necesariamente la pérdida de sus propiedades antioxidantes. Sin embargo, como antecedente que dio lugar a esta tesis, el Laboratorio de Antioxidantes del INTA ha demostrado que, sorprendentemente mezclas de metabolitos que se originan desde la oxidación de determinados flavonoides conservan en gran medida las propiedades químicas de eliminación/reducción de ROS cuando son comparados con sus moléculas originales. Además, se ha revelado que, en un caso particular, la mezcla de oxidación del flavonoide quercetina contiene un tipo de metabolito que es capaz de proteger las células contra ROS con una potencia de dos a tres órdenes de magnitud superior a la de su flavonoide precursor. Este metabolito corresponde a una benzoil-benzofuranona (BZF) generada tras el proceso de degradación oxidativa de ciertos flavonoides.

En base a la inesperada retención de propiedades antioxidantes de algunos flavonoides tras ser expuestos a oxidación y a la capacidad antioxidante notablemente superior del metabolito tipo BZF derivado de quercetina, en la presente propuesta se investigó si: mezclas de metabolitos generados tras la oxidación de una serie de flavonoides conformados por miricetina, fisetina, dideoxiquercetina, taxifolina, kaempferol, isoramnetina y morina son, al igual que quercetina, capaces de amplificar sus efectos antioxidantes celulares frente a los flavonoides de origen y si, tras este proceso de degradación oxidativa, dentro de dichas mezclas se genera el metabolito tipo BZF. La identidad estructural de las BZF se analizó mediante HPLC-ESI-MS/MS. La capacidad antioxidante y citoprotectora de cada mezcla oxidada y la de su correspondiente BZF aislada se probó en células Caco-2 expuestas al generador de ROS, indometacina. Adicionalmente, se evaluó el grado en que



la capacidad antioxidante de cada mezcla oxidativa se ve afectada por la sustracción química de sus benzofuranonas.

Se confirmó la formación de benzofuranonas en mezclas obtenidas tras la oxidación de los flavonoides miricetina, fisetina, kaempferol, isoramnetina y morina. Al comparar la capacidad antioxidante celular de las mezclas de metabolitos que contienen en su composición la BZF respectiva con las mezclas que no poseen este metabolito, se observó que las mezclas de metabolitos que resultan de la oxidación de los flavonoides, cuya estructura incluye un núcleo flavonol hidroxilado en los anillos A y B, y que además formaron las respectivas BZF, únicamente dichas mezclas fueron capaces de amplificar la capacidad antioxidante original. Estas mezclas oxidativas protegieron contra el estrés oxidativo, en una concentración hasta 100 veces inferior respecto al flavonoide de origen. Se demostró que tal aumento en la capacidad antioxidante radica exclusivamente en la presencia de las BZF en la composición de las mezclas generadas. Cuando se probaron las benzofuranonas aisladas, se observaron niveles de protección antioxidante aún más bajos, llegando hasta una amplificación antioxidante 5000 veces mayor de una BZF frente a su flavonoide original.

Los interesantes resultados aquí presentados abren la posibilidad de definir el esqueleto de las benzoil-benzofuranonas como una estructura base para el posterior desarrollo y/o diseño de nuevas moléculas antioxidantes.

## ABSTRACT

Flavonoids have attracted the attention of food chemists and biomedical researchers due to their widespread presence in edible plants and their potential to promote health actions. Although flavonoids can display a wide range of bioactivities, their antioxidant capacity, whether exerted through a direct or indirect ROS-scavenging action, or also by other enzymatic mechanisms, remains the most prominent bioactivity, with which these compounds are associated. Since ROS-induced oxidation of a flavonoid involves hydrogen/electron transfer reactions that initially compromise its phenolic groups and, ultimately its flavan backbone or core, it has long been assumed that oxidation of a flavonoid necessarily involves loss of its antioxidant properties. However, as an antecedent that gave rise to this thesis, the INTA Antioxidant Laboratory has surprisingly shown that mixtures of metabolites that originate from the oxidation of certain flavonoids largely retain the chemical properties of ROS elimination/reduction when compared to their parent molecules. In addition, it has been revealed that, in a particular case, the oxidation mixture of the flavonoid quercetin contains a type of metabolite that, is capable of protecting cells against ROS with a potency of two to three orders of magnitude higher than that of its precursor flavonoid. This metabolite corresponds to a benzoyl-benzofuranone (BZF) generated after the oxidative degradation process of certain flavonoids.

Based on the unexpected retention of antioxidant properties of some flavonoids after being exposed to oxidation and the notably higher antioxidant capacity of the quercetin-derived BZF-type metabolite, in the present proposal we investigated whether: mixtures of metabolites generated after the oxidation of a series of flavonoids made up of myricetin, fisetin, dideoxyquercetin, taxifolin, kaempferol, isoramnetin and morin are, like quercetin, capable of amplifying their cellular antioxidant effects against the flavonoids of origin and if, after this oxidative degradation process, within these mixtures the BZF-type metabolite. The structural identity of the BZFs was analyzed by HPLC-ESI-MS/MS. The antioxidant and cytoprotective capacity of each oxidized mixture and that of its corresponding isolated BZF was tested in Caco-2 cells exposed to the ROS generator, indomethacin. Additionally, the degree to which the antioxidant capacity of each oxidative mixture is affected by the chemical removal of its benzofuranones was evaluated.

The formation of benzofuranones was confirmed in mixtures obtained after the oxidation of the flavonoids myricetin, fisetin, kaempferol, isorhamnetin and morin. When comparing the cellular antioxidant capacity of the mixtures of metabolites that contain the respective BZF in their composition with the mixtures that do not have this metabolite, it was observed that only the mixtures of metabolites that result from the oxidation of flavonoids, whose structure includes a hydroxylated flavonol nucleus in rings A and B, and which also formed the respective BZF, only these mixtures were able to amplify the original antioxidant capacity. These oxidative mixtures protected against oxidative stress, at a concentration up to 100 times lower than the original flavonoid. It was shown that such an increase in antioxidant capacity lies exclusively in the presence of BZF in the composition of the mixtures generated after the oxidation of certain flavonoids. When isolated benzofuranones were tested, even lower levels of antioxidant protection were observed, down to a 5000-fold higher antioxidant amplification of a BZF versus its parent flavonoid.

The interesting results presented here open the possibility of defining the skeleton of benzoyl-benzofuranones as a base structure for the subsequent development and/or design of new antioxidant molecule.

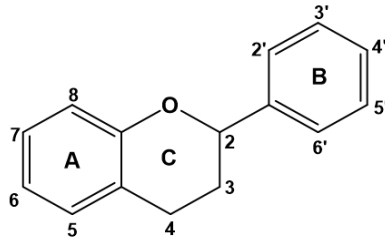
## 1. INTRODUCCIÓN

Durante décadas, los flavonoides, un tipo de compuesto bioactivo que se encuentra en varias plantas comestibles, han sido objeto de interés entre los investigadores biomédicos debido a su potencial para generar varios efectos biológicos ventajosos para la salud. (Mozaffarian *et al.*, 2018; Hussain *et al.*, 2020). Los estudios epidemiológicos han brindado el principal respaldo de los beneficios para la salud de los flavonoides, demostrando una correlación negativa entre el consumo de alimentos ricos en estos compuestos y la probabilidad de desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles (Wang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017; Leri *et al.*, 2020; Micek *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022).

Químicamente, los flavonoides pertenecen a una clase de moléculas caracterizadas por una estructura de núcleo flaván (C6-C3-C6, que se muestra en la Figura 1) que consta de dos anillos de benceno (A y B) conectados a través de tres átomos de carbono que forman un anillo heterocíclico de pirano (C). Esta estructura permite varias combinaciones en distintos patrones y sustituciones, lo que lleva a la formación de múltiples subclases de flavonoides. Los ejemplos de estas subclases incluyen flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles y antocianidinas.

Los flavonoides se pueden clasificar en diferentes subclases, pero si contienen grupos hidroxilo en sus anillos A y/o B, se clasifican como compuestos fenólicos (Speisky *et al.*, 2016). Igualmente que la subclasificación basada en la estructura, la presencia y ubicación de los grupos hidroxilo también juegan un

papel crucial en la determinación de las propiedades fisicoquímicas y los efectos biológicos de los flavonoides (Kumar *et al.*, 2013).



**Figura 1. Núcleo flavan.** Esqueleto 2-fenil-3,4-dihidro-2H-1-benzopirano, común a todos los flavonoides C6-C3-C6.

Los flavonoides exhiben una variedad de acciones biológicas, como antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, antiplaquetarias, antiaterogénicas, antiangiogénicas, antihiper glucémicas, dilatación de los vasos sanguíneos, normalización de lípidos y efectos antimicrobianos, según sus características estructurales únicas (Speisky *et al.*, 2016). Sin embargo, vale la pena señalar que la capacidad de actuar como antioxidante, lo que implica disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o aumentar su tasa de eliminación, es la única bioactividad común entre todos los flavonoides (Forman *et al.*, 2014).

Desde un punto de vista del mecanismo, la capacidad antioxidante de los flavonoides se atribuyó inicialmente a su capacidad demostrada *in vitro* para actuar como antioxidantes directos a través de un mecanismo de eliminación de ROS (Guterridge & Halliwell, 2000). Sin embargo, la posibilidad real de que los flavonoides actúen *in vivo* a través de dicho mecanismo se ha cuestionado cada

vez más sobre la base de consideraciones de restricción cinética (Galleano *et al.*, 2010) y la diferencia cercana a dos órdenes de magnitud que existe entre las concentraciones de flavonoides requeridas *in vitro* para ejercer una acción eliminadora de ROS y las alcanzadas *in vivo* después de su consumo dietético (Mladenka *et al.*, 2010; Hollman *et al.*, 2011). No obstante, durante la última década considerables evidencias indican que los flavonoides, además o en lugar de actuar como captadores de ROS, podrían ejercer una acción antioxidante intracelular a través de otros mecanismos, que son operativos *in vivo* y que parecen requerir concentraciones más bajas (Dinkova-Kostova & Talalay, 2008; Oteiza *et al.*, 2021). Dichos mecanismos, que conducen a las denominadas acciones antioxidantes indirectas, comprenden principalmente la regulación al alza, mediada por el factor nuclear derivado de eritroides similar a 2 (Nrf2), de la expresión de genes que codifican para la eliminación de ROS y/o enzimas sintetizadoras de antioxidantes (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005; Dinkova-Kostova & Talalay, 2008; Sies *et al.*, 2017).

Además de afectar la capacidad antioxidante celular, los flavonoides pueden no sufrir cambios estructurales o modificaciones químicas que podrían afectar significativamente sus propiedades antioxidantes originales, según el mecanismo involucrado. Por ejemplo, ciertos flavonoides que se basan en la reducción o eliminación de ROS para ejercer sus efectos pueden perder su actividad antioxidante si se dañan las fracciones fenólicas activas redox presentes en su estructura. Este escenario ilustra un ejemplo de tales flavonoides

que experimentan cambios que comprometen su potencial antioxidante (Átala *et al.*, 2017). Por lo general, se puede suponer que el modo de acción directo de la reducción o eliminación de ROS que involucra la oxidación de residuos fenólicos da como resultado la pérdida o el compromiso de las propiedades antioxidantes de los flavonoides. Esto se debe a que la conformación estructural de estos residuos fenólicos sufre un cambio (como la formación de una quinona a través de la oxidación de grupos hidroxilo en el anillo B de ciertos flavonoides) durante su interacción con ROS, lo que lleva a la donación de un electrón o protón. de su estructura para estabilizar o extinguir las ROS (Di meo *et al.*, 2013). No obstante, durante los últimos veinte años, ha surgido evidencia significativa que sugiere que, para ciertos flavonoides, la oxidación de sus grupos fenólicos es vital para permitirles exhibir efectos antioxidantes (Lee-Hilz *et al.*, 2006; Bolton *et al.*, 2017). Como resultado, las especies antioxidantes activas que realmente cumplirían el propósito son uno o más de los metabolitos generados a partir de la oxidación de la molécula de flavonoide.

De hecho, se observó que después de inducir la oxidación de la quercetina, uno de los flavonoides más estudiados (D' Andrea *et al.*, 2015), se forma una mezcla de metabolitos libre de quercetina (Qox) que conserva en gran medida la eliminación de ROS (medido a través de ensayo ORAC) y las propiedades reductoras de ROS (medido a través del ensayo FRAP y TPC) del flavonoide no oxidado (Atala *et al.* 2017). Con respecto a las consecuencias antioxidantes de este discutible hallazgo, en 2017 investigadores del Laboratorio

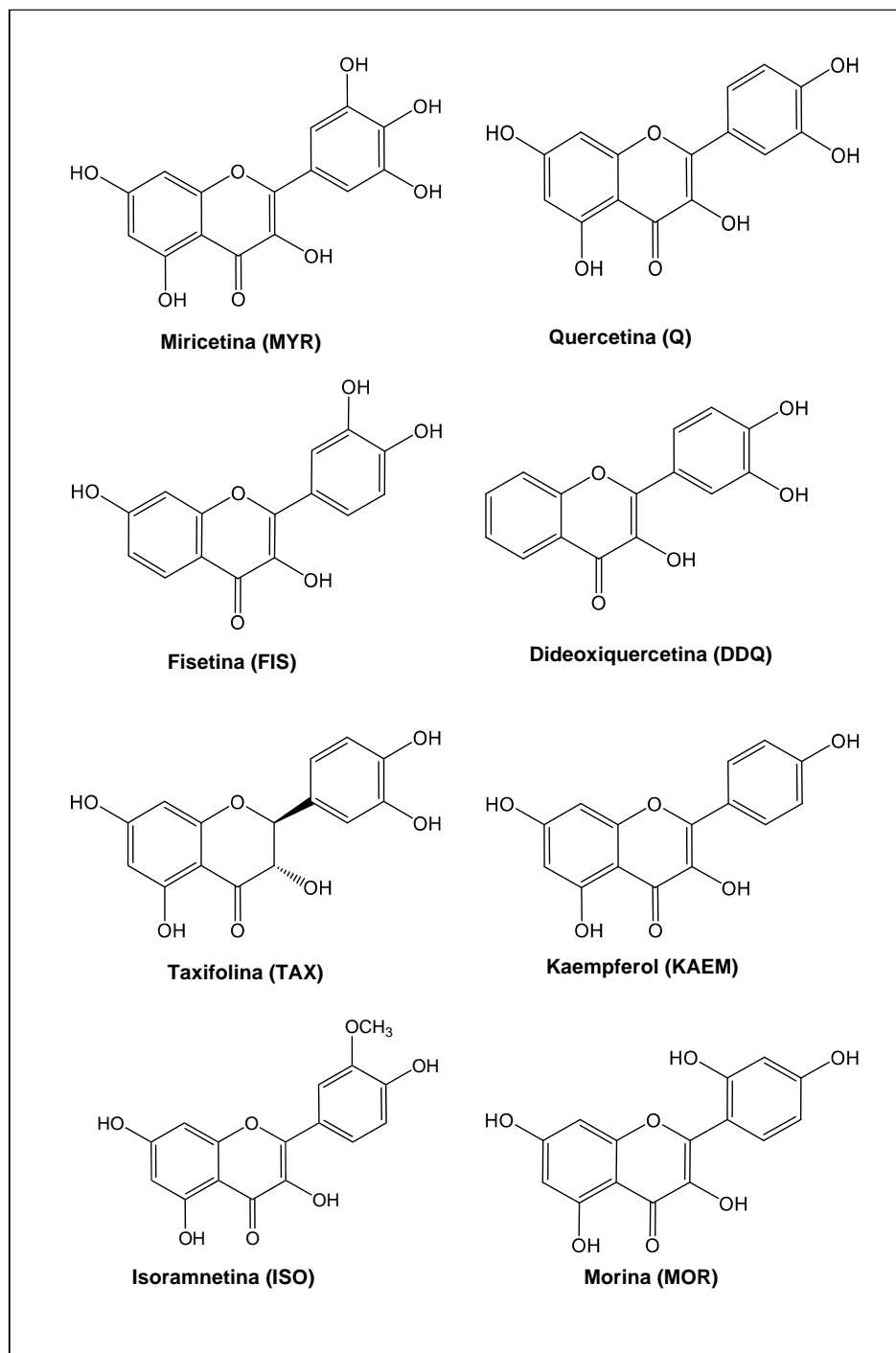
de Antioxidantes del INTA (lugar de realización de esta tesis) exploraron la capacidad de Qox para proteger a las células Hs68 y Caco-2 del daño oxidativo causado por varios ROS. Sorprendentemente, se descubrió que la mezcla Qox brindaba protección total a una concentración equivalente 20 veces menor que la de la quercetina. Impulsados por el aumento inesperado en la potencia antioxidante inducida por la oxidación de este flavonoide, se aisló e identificó aisló (mediante HPLC-DAD-ESI-MS/MS) un total de once metabolitos principales de Qox y, posteriormente, se evaluó la capacidad antioxidante de cada uno de ellos, en células expuestas a ROS. Únicamente un metabolito de los 11 identificados en Qox, que fue determinado como 2-(3,4-dihidroxibenzoil)-2,4,6-trihidroxi-3(2H)-benzofuranona (Q-BZF), pudo adscribir los efectos antioxidantes observados en Qox. La evidencia de esto provino de la prueba de la actividad antioxidante de la benzoil-benzofuranona (BZF) aislada desde Qox y de la comparación de la actividad antioxidante de preparaciones de Qox con y sin la BZF. Luego de aislar este metabolito, se descubrió que Q-BZF brinda protección completa contra el aumento del tono oxidativo intracelular inducido por indometacina en una concentración 200 veces menor que la de quercetina. La concentración de Q-BZF se estimó en base a la cantidad de quercetina expuesta inicialmente a la oxidación (Fuentes *et al.* 2017).

Lo anterior sugiere la existencia de dos puntos de vista aparentemente contradictorios sobre los efectos de los flavonoides como secuestrantes de ROS. Un punto de vista enfatiza la importancia de que los flavonoides estén en su forma no oxidada, mientras que el otro sugiere que la oxidación previa de los



flavonoides es necesaria para mejorar o mantener sus propiedades antioxidantes.

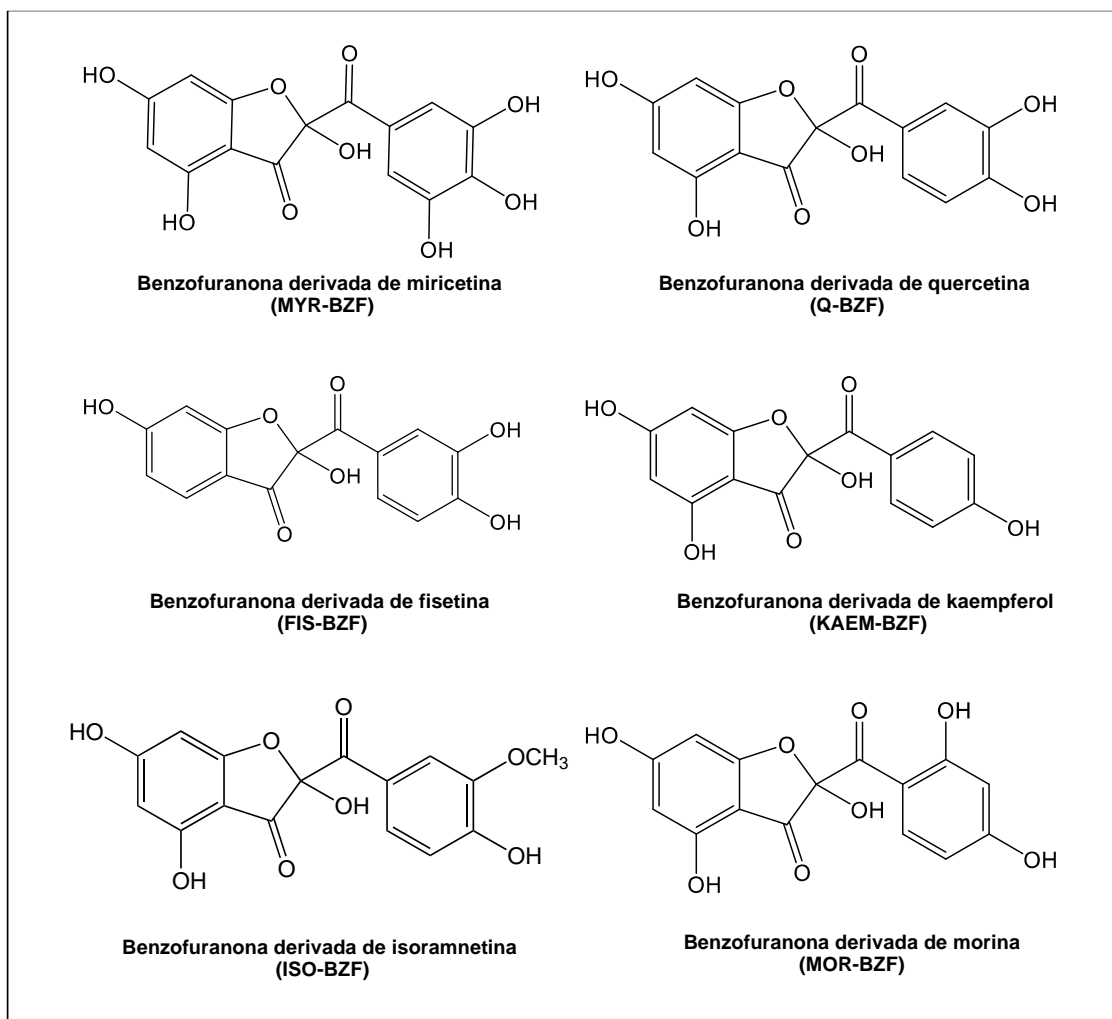
Con el objetivo de investigar el impacto de la oxidación de flavonoides sobre sus propiedades antioxidantes y determinar si conduce a una disminución, conservación o aumento de sus propiedades antioxidantes, esta tesis doctoral indaga que en si, las mezclas de metabolitos resultantes de la oxidación de una serie de siete flavonoides análogos estructuralmente a quercetina, como miricetina, fisetina, dideoxiquercetina, taxifolina, kaempferol, isoramnetina y morina (Figura 2) presentan o no una capacidad antioxidante superior a la del flavonoide no oxidado del que se originan. Esta capacidad antioxidante se evaluó en células Caco-2 expuestas a ROS, generados mediante el tratamiento con el antiinflamatorio no esteroide (AINE) indometacina (INDO).



**Figura 2.** Estructuras químicas de los flavonoides en estudio.

Además de la BZF derivada de la quercetina, estudios previos a esta tesis han reportado la formación de las BZF provenientes de la oxidación, inducida a través diversas metodologías, de otros flavonoles: como kaempferol (por oxidación electroquímica y en medio alcalino) (Jørgensen *et al.*, 1998; Jungbluth & Ternes, 2000), morina, miricetina (por oxidación en medio alcalino) (Jungbluth & Ternes, 2000), fisetina (por oxidación electroquímica y en medio alcalino) (Jungbluth & Ternes, 2000); Jurasekova *et al.*, 2014; Ramešová *et al.*, 2015; Sokolová *et al.* 2016), ramnazina (Ramešová *et al.*, 2014) y ramnetina (ambas por oxidación electroquímica) (Ramešová *et al.* 2017). Desde el punto de vista de los requisitos estructurales, la formación de BZF parece exigir que el flavonoide contenga un grupo hidroxilo en C3, un doble enlace en C2-C3 y al menos un grupo hidroxilo en el anillo B (Jørgensen *et al.*, 1998; Jungbluth & Ternes, 2000; Awad *et al.*, 2001; Ramešová *et al.*, 2015). Considerando el caso de Q, cuyo Qox exhibió un incremento de 20 veces, y su correspondiente BZF un incremento de a lo menos 200 veces, se plantea la hipótesis de que solo las mezclas que resultan de la oxidación de los flavonoides formadores de BZF (es decir, flavonoles con al menos un grupo hidroxilo unido al anillo B), y no los resultantes de los otros flavonoides elegidos, exhibirán actividad antioxidante considerablemente mayor (protegiendo las células expuestas a ROS). En esta tesis se propone que, en las mezclas de oxidación que contengan BZF en su composición, el incremento esperado en la actividad antioxidante se explicaría principalmente por la presencia de BZF en su composición (a evaluar por HPLC-DAD-ESI-MS/MS). Para probar el último postulado, se evaluó la actividad

antioxidante de las mezclas que contienen BZF y se comparará con la de preparaciones idénticas de las que se ha eliminado experimentalmente el BZF. En la Figura 3 se muestran las estructuras químicas de las BZF identificadas y estudiadas en este trabajo.



**Figura 3.** Estructuras químicas de las benzoil-benzofuranonas derivadas de flavonoides en estudio

## 2. HIPÓTESIS:

*De acuerdo con lo observado en el caso quercetina y la amplificación antioxidante exhibida por Qox, de la cual resulto ser únicamente responsable Q-BZF,*

Si entre los flavonoides seleccionados en este estudio, sólo aquellos que cumplan con los requerimientos estructurales para generar una benzoil-benzofuranona (que en su estructura flavan se incluye un doble enlace en C2-C3, un hidroxilo en C3 y un grupo ceto en C4 y al menos otro hidroxilo en el anillo B), tras ser sometidos a oxidación verían aumentada su capacidad antioxidante respecto a la del flavonoide precursor, y este incremento en la capacidad antioxidante sería atribuido exclusivamente a la presencia de las benzoil-benzofuranona en la composición de las mezclas de metabolitos obtenidas durante el proceso de oxidación.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General:**

Evaluar el potencial de las benzoil-benzofuranonas generadas durante la oxidación de ciertos flavonoides para actuar como potentes antioxidantes en células expuestas a condiciones de daño oxidativo.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

1. Establecer las condiciones experimentales necesarias para inducir la oxidación de los ocho flavonoides en estudio, asegurando en cada caso su total desaparición.
2. Evaluar en células expuestas a ROS la actividad antioxidante de las mezclas de metabolitos que resultan de la oxidación completa de cada uno de los ocho flavonoides (FLox), comparando dichas actividades con las de los flavonoides no oxidados a partir de los cuales dichas mezclas se originan.
3. Evaluar la presencia (o ausencia) de las benzofuranonas en las mezclas de metabolitos que resultan de la oxidación de cada uno de los ocho flavonoides a estudiar.
4. Investigar si la eliminación experimental de las benzofuranonas desde las mezclas que las contienen (Obj.3) da como resultado la pérdida total de la actividad antioxidante observada originalmente en las mismas mezclas.

5. Aislar y purificar las benzofuranonas de aquellas mezclas de flavonoides oxidados en las cuales su presencia haya sido ya establecida (en Obj. 3).
6. Evaluar en células expuestas a ROS la actividad antioxidante de las benzofuranonas aisladas en Obj. 5, estableciendo "índices de amplificación antioxidante" y relaciones estructura-actividad.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Reactivos

Quercetina, kaempferol, fisetina, isoramnetina, miricetina, morina, dideoxiquercetina, taxifolina, acetato de sodio, fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de sodio, 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCHFD), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazolium bromuro, indometacina e hidróxido de sodio fueron obtenidos de Sigma Aldrich. Acetonitrilo, ácido fórmico, ácido acético y etanol de grado HPLC fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania). CytoTox-ONE® Homogeneous Membrane Integrity Assay kit fue obtenido de Promega (Madison, WIS, EE.UU.). Nuclear Extraction kit fue obtenido de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE. UU.) NF- $\kappa$ B p65 (Total) ELISA kit fue obtenido de Invitrogen™ (CA, EE. UU.),

### 4.2 Métodos relacionados con el objetivo específico 1

*Establecer las condiciones experimentales necesarias para inducir la oxidación de los ocho flavonoides en estudio, asegurando en cada caso su total desaparición.*

#### 4.2.1 Oxidación de flavonoides

Se indujo la oxidación de cada flavonoide sometiendo estos compuestos a condiciones alcalinas (después de solubilizar cada FL en un volumen mínimo



de etanol). Se adicionó NaOH (1 N, pH > 12) y se incubó a 25 °C en el caso de miricetina, quercetina, fisetina, dideoxiquercetina, taxifolina e isoramnetina y 40 °C para kaempferol y morina, en condiciones controladas de agitación y exposición al aire, durante diferentes períodos de tiempo (en base a lo realizado en Atala *et al.*, 2017). Para monitorear la extensión (y determinar el total) de la desaparición oxidativa de cada FL, las muestras tomadas a lo largo de las incubaciones se acidificaron rápidamente para detener la reacción y se diluyeron a una concentración de 1 mM del FL en estudio (tampón de acetato de sodio 75 mM y 10 mM respectivamente a pH 3,5) e inmediatamente después se sometieron a análisis de HPLC-DAD. Las condiciones cromatográficas son las descritas en Fuentes *et al.* 2017, de la siguiente manera: velocidad de flujo 0.8 mL/min; columna Kromasil 100-5-C18; 250 × 4,6 mm, 5 µm; horno de columna a 25 °C. La composición de la fase móvil, que consistirá en una mezcla de (A) acetonitrilo y (B) ácido fórmico acuoso al 0,1%, que se variará empleando un programa de gradiente: 0-15.0 min, 10% A; 15.0-50.0 min, 10-60% A. La desaparición de los FL se controla dependientemente de su longitud de onda en el máximo de absorción ( $\lambda_{max}$ ), 370 nm para quercetina, miricetina y isoramnetina; 360 nm para fisetina, 368 nm para kaempferol, 354 nm para morina, 362 nm para dideoxiquercetina y 290 nm para taxifolina. La variación en el área bajo la curva (ABC) de cada FL en el tiempo es comparada con la ABC de una muestra de FL solubilizada únicamente en etanol (FL sin oxidar). El tiempo de oxidación total de cada FL corresponde al tiempo en el cual la concentración remanente alcanza entre 2.0 y 4.0%, desde este momento las soluciones correspondientes a las

"mezclas de metabolitos" generadas tras la oxidación de los flavonoides son, en adelante llamadas como FLox.

### **4.3 Métodos relacionados con el objetivo específico 2**

*Evaluar en células expuestas a ROS la actividad antioxidante de las mezclas de metabolitos que resultan de la oxidación completa de cada uno de los quince flavonoides (FLox), comparando dichas actividades con las de los flavonoides no oxidados a partir de los cuales dichas mezclas se originan.*

#### **4.3.1 Condiciones de cultivo celular**

Se utilizó la línea celular de adenocarcinoma de colon humano, Caco-2 entre pasaje 10 a 25 para los experimentos. Estas células se mantuvieron en un medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de antibióticos y 1% de aminoácidos no esenciales a 37 °C en un incubador humidificado con 5% CO<sub>2</sub>/95% aire. Se utilizaron células en crecimiento con una confluencia cercana al 90% (no diferenciadas).

### 4.3.2 Estrés oxidativo intracelular

Las células fueron sembradas ( $1 \times 10^5$  células/pocillo) en microplacas de 96 pocillos por 24 h (tiempo en el cual alcanzan una confluencia cercana al 90%), luego de este tiempo se mide el estrés oxidativo celular. El estrés oxidativo intracelular fue determinado por medio de la oxidación de DCHF (diclorohidrofluoresceína) hacia su compuesto fluorescente DCF (diclorofluoresceína), utilizando el protocolo de Jiménez et al., (2002). Las células fueron incubadas con DCHFD (diclorohidrofluoresceína diacetato) 50  $\mu$ M por 30 min y después de lavarlas con PBS, las células se incubaron con indometacina (INDO; 325  $\mu$ M) en ausencia o presencia de cada flavonoide (QUE, MYR, FIS, KAEM, ISO, MOR, DDQ, TAX), de cada mezcla FLox generada (QUEox, MYRox, FISox, KAEMox, ISORox, MORox, DDQox y TAXox). Los flavonoides se adicionaron a las células en un rango de concentraciones entre 0,001-10  $\mu$ M. Las "concentraciones" que se evaluaron en el caso de cada FLox se calcularon en función de la cantidad de flavonoide sometido a oxidación. Para las concentraciones evaluadas, todos los tratamientos se diluyeron en tampón de fosfato de sodio (25 mM, pH 7,0). Después de 40 min de incubación, se retiraron los sobrenadantes y las células se lavaron con PBS y se lisaron mediante la adición de Triton X-100 (0,1%). Después de 10 minutos, se midió la fluorescencia celular de la diclorofluoresceína ( $EX_{495nm}/EM_{529nm}$ ) utilizando un multilector Synergy 2 (Biotek, Winooski, VT, EE. UU.). La concentración de proteínas se midió en el

lisado celular utilizando el reactivo de Bradford (BioRad, CA, EE. UU.). Para expresar el estrés oxidativo (EO), se asignó un valor de 100% de EO a las células tratadas con INDO y corresponde a la diferencia que resulta de restar la fluorescencia emitida por las células expuestas a PBS ( $FL_{PBS}$ ) de la fluorescencia emitida por las células tratadas con INDO ( $FL_{INDO}$ ). Para todas las demás condiciones tratadas con células, el porcentaje se estimó multiplicando la siguiente ecuación por 100:  $FL_{EXP} - FL_{PBS} / FL_{INDO} - FL_{PBS}$ .  $FL_{EXP}$  corresponde a la fluorescencia emitida por las células tratadas con cada flavonoide, por cada FLox y por cada BZF aislada.

### **4.3.3. Determinación de citotoxicidad y viabilidad celular**

#### **4.3.3.1. Reducción de MTT**

La viabilidad celular fue determinada por medio de la reducción metabólica de MTT a formazán, un compuesto de color azul ( $DO_{540nm}$ ), según protocolo de Hong *et al.*, (1998) y Zhou *et al.*, (2001). Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Las células son sembradas ( $1 \times 10^5$  células/pocillo) en microplacas de 96 pocillos por 24 h. Después de lavar con PBS, se añadieron a cada pocillo 20  $\mu$ L de 2,5 mg/mL de MTT y 80  $\mu$ L de PBS, y las células se incubaron durante 150 min a 37 °C (5% CO<sub>2</sub>/ 95% aire). Se descartó el sobrenadante y se añadieron 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido para disolver

el formazán. Después de 10 min de incubación a 37 °C, se midió la absorbancia a 540 nm (Carrasco-Pozo *et al.* 2010). La viabilidad celular fue estimada como:  $\% \text{ Viabilidad Celular} = (\text{DO}_{\text{Experimental}} \times 100) / \text{DO}_{\text{control}}$ . Los resultados se expresan como el porcentaje de reducción de MTT. Se estimó una reducción de MTT del 100 % en las células tratadas con PBS.

#### **4.3.3.2. Liberación de LDH**

Se utilizó como marcador de la toxicidad celular la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) hacia el medio extracelular que fue medido utilizando Cytotox- ONE Homogeneous Membrana Integrity Assay. Este kit permite medir por fluorescencia (560<sub>Ex</sub>/590<sub>Em</sub>) la liberación de LDH desde las células con la membrana dañada. Por medio de la medición de LDH se puede estimar el número de células no-viables presentes en el cultivo, debido a que la viabilidad celular se basa en la integridad de la membrana celular. La medición de LDH liberada al medio se basa en la conversión de resazurin a resofurin, utilizando un sistema enzimático. Las células son sembradas (1 x 10<sup>5</sup> células/pocillo) en microplacas de 96 pocillos por 24 h. Los resultados se expresan como porcentaje de LDH filtrado al medio extracelular. Se estimó un valor basal del 15% en células tratadas con PBS.

#### **4.4 Métodos relacionados con el objetivo específico 3**

*Evaluar la presencia (o ausencia) de las benzofuranonas en las mezclas de metabolitos que resultan de la oxidación de cada uno de los ocho flavonoides a estudiar.*

##### **4.4.1 Búsqueda, aislamiento e identificación de benzoil-benzofuranonas (BZF).**

Para investigar la presencia de BZF en las mezclas de metabolitos que resultan de la oxidación de los flavonoides en estudio (FLox), se examinaron cromatogramas HPLC de sus correspondientes FLox para aquellos picos que, eluyendo en tiempos ( $t_R$ ) antes que su correspondiente flavonoide (todas las BZF son más polares) y exhiben un pico característico cuya absorción máxima está dentro del rango de 286-296 nm. Dicho rango de longitud de onda comprende el máximo empleado por otros investigadores que identificaron las BZF correspondiente a la oxidación de cada uno de los siguientes flavonoides: quercetina (293 nm), fisetina (286 nm), kaempferol (292 nm), miricetina y morina (293 nm) (Jungbluth & Ternes, 2000). La fracción correspondiente al pico seleccionado se recogió mediante un recolector de fracciones automatizado (Agilent 1260 Infinity acoplado al HPLC mencionado anteriormente), y para asegurar su estabilidad química, la fracción eluida se llevó a sequedad inmediatamente después, utilizando un evaporador rotatorio a 40 °C. Para asegurar la inocuidad del proceso de secado, se volvió a cromatografiar una

muestra de la fracción ya seca, evaluando su pureza y estabilidad en cuanto a la conservación del  $t_R$  y el área bajo la curva de la presunta BZF, así como la no formación de nuevos picos. Para confirmar la identidad química de la molécula presente en las fracciones reconstituidas asociadas a BZF, estas últimas se sometieron a análisis UHPLC-ESI-MS/MS utilizando un sistema Shimadzu (Kyoto, Japón) Nexera X2 UHPLC que consta de una bomba LC-30 AD, una unidad de desgasificación DGU-20A5R, un muestreador automático SIL-30 AC, un horno de columna CTO-20 AC, un módulo de comunicación CBM-20A, un detector de matriz de diodos (DAD) SPD-M20A y un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo LCMS-8030. Los datos fueron adquiridos y registrados por medio del software Shimadzu LabSolutions versión 5.51. Los caudales, columna de HPLC/columna de horno, composición/gradiente de fase móvil fueron los mismos parámetros utilizados en 4.2.1. La interfaz de ionización por electrospray (ESI) se operó en modo negativo con un voltaje capilar de 4.5 kV, temperatura de la línea de desolvatación de 250 °C, temperatura del bloque de calor de 400 °C, gas de nebulización (N) 3,0 L min<sup>-1</sup> y gas de secado (N<sub>2</sub>) 15,0 L min<sup>-1</sup> y gas de colisión (Ar) 230 kPa. La energía de colisión se optimizó para todos los compuestos a 20 V y la adquisición de datos se obtuvo en el modo de monitoreo de un solo ion y en el modo de reacción múltiple. Los valores de m/z a obtener en nuestros estudios se compararán con los ya reportados para el BZF (en modo negativo): 301.04, 273.04, 191.00, 153.02 y 135.00 para fisetina (Ramešová *et al.*, 2015), 317, 289, 207 y 151 para quercetina (Zhou and Sadik, 2000). Los valores reportados para kaempferol son 301, 273, 257 y 191, y para morina 317,

273, 207 y 191 (Jungbluth y Ternes, 2000). Dado que, a la fecha, aún no se ha informado de la formación de BZF derivada de dideoxiquercetina, isorhamnetina, y sobre análisis de espectrometría de masas para la BZF de miricetina, no hay información sobre sus valores  $m/z$ . Sin embargo, según el mecanismo por el cual los flavonoles que contienen un hidroxilo en el anillo B se convierten en su BZF correspondiente (Ramešová et al. 2014), se buscó que los valores de  $[M-H]^-$  de dichas BZF sean 16 u.m.a más altos que los del flavonoide del que proceden, y que estos valores vayan acompañados de la  $m/z$  correspondiente a su particular patrón de fragmentación.

#### **4.5 Métodos relacionados con el objetivo específico 4**

*Investigar si la eliminación experimental de las benzofuranonas desde las mezclas que las contienen (Obj.3) da como resultado la pérdida total de la actividad antioxidante observada originalmente en las mismas mezclas.*

##### **4.5.1 Obtención de mezclas FLox libre de BZF mediante sustracción química y comparación de su capacidad antioxidante celular con las mezclas FLox completas.**

Para dilucidar la contribución de BZF al efecto antioxidante de las mezclas FLox que contienen dicho metabolito (determinado en punto 4.4), se realizó una sustracción química de este metabolito mediante HPLC acoplado al colector de fracciones descrito anteriormente. Cada FLox se inyectó en el HPLC (mismas



condiciones descritas en 2.2), y se eluyó el volumen total separados en fracciones. Los intervalos de tiempos para fraccionamiento de cada FLox se muestran en la Tabla 1, se consideran los tiempos en base a la capacidad máxima de los contenedores de fracciones (6 mL) y los peaks detectados dentro de cada FLox.

**Tabla 1.** Intervalo de tiempo de las fracciones realizadas para la sustracción química de cada BZF desde su respectivo FLox

Fracción	Rango de tiempo en minutos dentro de la corrida cromatográfica donde se fracciona el volumen eluido					
	MYRox	Qox	FISox	KAEMox	ISORox	MORox
1	0 - 7,5	0 - 7,5	0 - 7,5	0 - 7,3	0 - 7,5	0 - 6,5
2	7,7 - 15,2	7,7 - 15,2	7,7 - 15,2	7,5 - 15,0	7,7 - 15,2	6,7 - 14,2
3	15,4 - 19,3	15,4 - 22,9	15,4 - 22,9	15,2 - 22,7	15,4 - 22,9	14,4 - 21,9
4	19,8 - 21,8	23,1 - 27,2	23,1 - 27,1	22,9 - 28,0	23,1 - 27,3	22,1 - 29,6
5	22,3 - 28,6	27,7 - 28,3	27,6 - 28,3	28,2 - 31,0	27,5 - 31,7	29,8 - 32,5
6	28,8 - 31,8	28,8 - 35,8	28,8 - 35,8	31,5 - 32,5	32,2 - 32,9	33,0 - 33,9
7	32,0 - 39,5	36,0 - 43,0	36,0 - 43,5	33,0 - 40,5	33,4 - 40,9	34,4 - 41,9
8	39,7 - 47,2	43,2 - 50,0	43,7 - 50,0	40,7 - 48,2	41,1 - 45,0	42,1 - 47,0
9	47,4 - 50,0			48,4 - 50	45,0 - 50,0	47,2 - 50,0

*Con color se destaca la fracción que contiene a las BZF respectivas a cada FLox*

Para formar cada FLox libre de BZF se reunió todo el volumen eluido a excepción de la fracción que contiene la BZF y luego se llevó inmediatamente a sequedad utilizando un evaporador rotatorio a 40°C. Antes de evaluar la actividad antioxidante en las células, cada FLox libre de BZF se reconstituyó en tampón de fosfato de sodio (25 mM, pH 7,4) y se reinyectó una muestra en el HPLC-DAD para garantizar que el FLox seco libre de BZF conserva todas las características cromatográficas (en cuanto a número de peaks y  $t_R$ ) y descartar la presencia de

BZF en su composición. Para realizar una adecuada comparación de los efectos antioxidantes celulares, por otra parte se colectó el volumen total eluído ahora sin descartar el peak correspondiente a la BZF para obtener un FLox completo, que de igual manera fue secado y se reconstituyó en tampón de fosfato de sodio (25 mM, pH 7,4) e inmediatamente fue re-cromatografiado para garantizar la integridad de su composición. En paralelo, también la fracción “aislada”, que corresponde a la BZF, fue llevada a sequedad y luego reconstituída en tampón fosfato de sodio para ser testada en células dentro del mismo experimento.

Después de obtener las tres preparaciones, es decir, FLox completos, FLox libres de BZF y el peak fraccionado que contiene a la BZF, sus capacidades antioxidantes se evaluaron en células Caco-2 expuestas a ROS, como se describe en punto 4.3.2. Los tratamientos se adicionan a las células a la CE<sub>80</sub> determinada para cada FLox en el Objetivo 2. Esto se lleva a cabo relacionando el área obtenida por HPLC de la fracción de BZF aislada, con el área de este peak ahora dentro FLox (cuando el FLox es inyectado en el HPLC a una concentración conocida previamente). Luego este peak con la BZF reconstituída se diluye, en el mismo tampón fosfato, hasta la concentración requerida para los experimentos celulares. Las concentraciones de los otros tratamientos (FLox completo y FLox libre de BZF) se prepararon en base a las mismas diluciones aplicadas anteriormente para la fracción de BZF aislada correspondiente.

#### **4.6 Métodos relacionados con el objetivo específico 5 y 6**

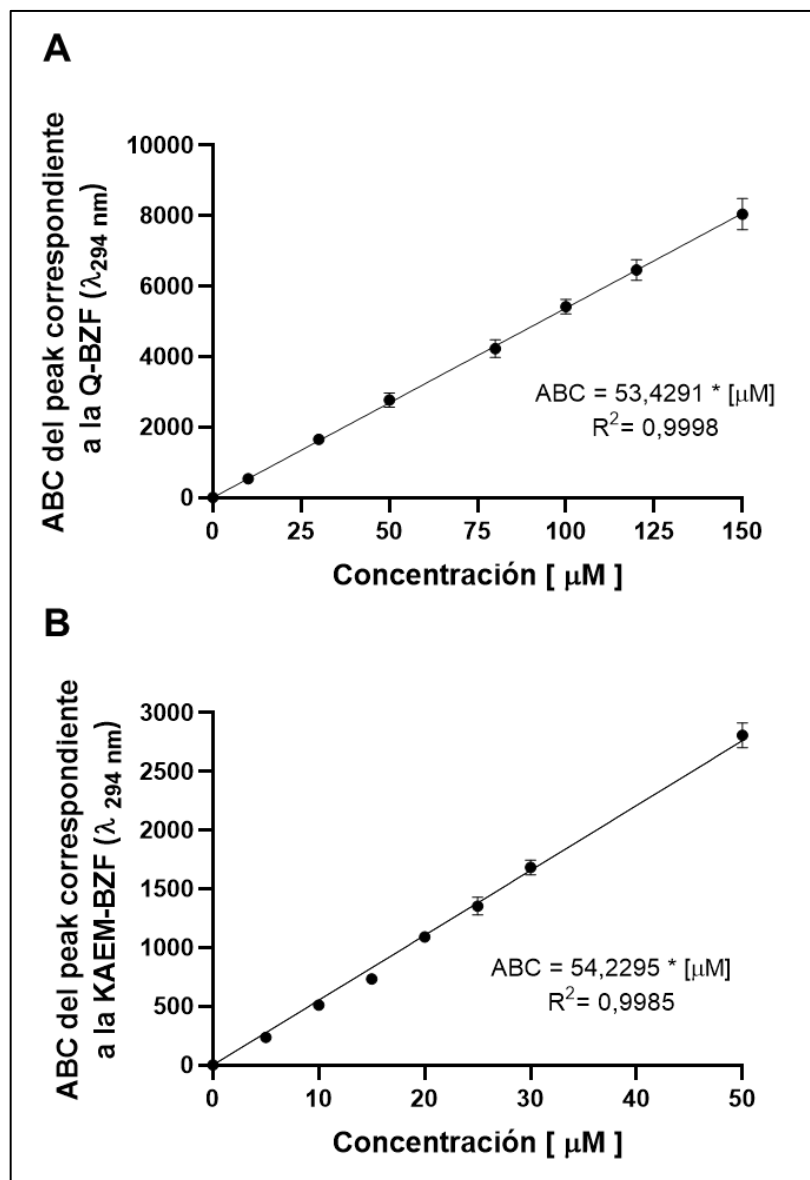
*Aislar y purificar las benzofuranonas de aquellas mezclas de flavonoides oxidados en las cuales su presencia haya sido ya establecida (en Obj. 3).*

*Evaluar en células expuestas a ROS la actividad antioxidante de las benzofuranonas aisladas en Objetivo 5, estableciendo "índices de amplificación antioxidante" y relaciones estructura-actividad.*

##### **4.6.1. Curva de calibración para Q-BZF y KAEM-BZF**

Luego de obtener la confirmación por HPLC-ESI-MS/MS de los peaks que contienen a las BZF derivadas de la oxidación de quercetina y kaempferol, se extrajo una preparación de cada uno de estos peaks por separado, que fue llevada a sequedad en evaporador rotatorio a 40 °C y fue reconstituida en etanol para medir su absorbancia mediante un espectrómetro a su respectiva  $\lambda_{\max}$  reportada por Jorgensen *et al.*, 1998 y con este valor desprender la concentración (mediante ecuación de Lambert-Beer) de la muestra ya que estos autores además reportan el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de ambas BZF en etanol. Para Q-BZF describen la  $\lambda_{\max}$  en 293 nm y el  $\epsilon$  en 21900 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> y para KAEM-BZF  $\lambda_{\max}$  en 296 nm y el  $\epsilon$  en 19900 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Luego de obtenida la concentración de ambas preparaciones de BZF, se realizan diferentes diluciones entre 1-150  $\mu$ M para Q-BZF y para KAEM-BZF entre 1-50  $\mu$ M. Cada una de estas diluciones fue inyectada al HPLC por separado para obtener el ABC del peak

correspondiente a la BZF en estudio, se construyó la respectiva curva de calibración para ambas BZF. Las curvas de calibración obtenidas para la Q-BZF y KAEM-BZF se muestran en la Figura 4.



**Figura 4. Curvas de calibración para las BZF de quercetina y kaempferol.** (A) corresponde a Q-BZF y (B) corresponde a KAEM-BZF. En la figura se muestran las ecuaciones correspondientes que relacionan en área bajo la curva (ABC) de los peak cromatográficos de ambas BZF con la concentración en unidades  $\mu$ M.

#### **4.6.2 Aislación de BZF para ensayos celulares y evaluación de la capacidad antioxidante y citoprotectora de estos metabolitos aislados.**

Mediante un equipo de HPLC a escala semipreparativa, con detector UV-Visible, se aislaron las BZF de aquellos FLox en los que ya se había establecido su presencia (Obj. 3). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron esencialmente las mismas que las ya descritas en el Obj. 1 para el HPLC analítico, excepto por el aumento de tamaño tanto de la columna Kromasil 100-5-C18 (250 × 10 mm, 5 µm) como del flujo (3.78 mL/min) que fue utilizado. Para establecer el  $t_R$  de cada una de las BZF a aislar bajo estas condiciones cromatográficas, se usó una muestra del BZF obtenido previamente a través de la separación de HPLC analítica (en Obj. 3). Para aislar cantidades adecuadas de cada BZF, el HPLC semipreparativo se cargó con 2,0 mL cada vez, con inyecciones repetidas de FLox y se recogieron las fracciones correspondientes a las BZF, y fueron llevadas a sequedad mediante rotavapor a 40 °C. El sólido seco obtenido fue reconstituido en tampón de fosfato de sodio (25 mM, pH 7,0) previo a su uso en los experimentos contemplados en Obj. 6. Antes de la ejecución de tales experimentos, sin embargo, una muestra de cada BZF seca y recién reconstituida se volvió a inyectar en el HPLC-DAD analítico para cerciorarse de que conserva sus características cromatográficas originales. Además, se reinyectó durante las dos horas posteriores a su reconstitución para determinar

la estabilidad de la BZF aislada en el tampón fosfato de sodio (25 mM, pH 7,4) utilizado para los ensayos celulares.

Para evaluar la actividad antioxidante de las BZF aisladas, estos compuestos se disolvieron en el tampón de fosfato de sodio antes referido y fueron adicionados, en un amplio rango de concentraciones, a células Caco2 expuestas a ROS para evaluar su capacidad antioxidante celular y sus propiedades citoprotectoras (como se describe en punto 4.3.2 y 4.3.3). En el caso de las BZF derivadas de miricetina, fisetina, isoramnetina y morina, las concentraciones ensayadas se estimaron relacionando al área detectada de cada una de las BZF dentro de sus respectivos FLox (cuando estos son inyectados en el HPLC a una concentración conocida) con el área del peak de BZF obtenido luego de su aislamiento y posterior reconstitución en tampón fosfato, por ello estas concentraciones se denominan “*concentraciones equivalentes*”. En la Tabla 2 se muestran las áreas promedio de cada peak asociado a la BZF dentro de respectivo FLox cuando este es inyectado a una concentración de 1 mM en HPLC-DAD.

**Tabla 2.** Áreas promedio detectadas por HPLC-DAD del peak asociado a la BZF dentro de cada FLox.

	MYR-BZF	FIS-BZF	ISO-BZF	MOR-BZF
Área promedio del peak asociado a la BZF (detectado a su $\lambda_{max}$ ) dentro del respectivo FLox cuando se inyecta esta mezcla a una concentración de 1mM en HPLC-DAD	12000 UA	450 UA	1500 UA	1200 UA

Por otra parte, únicamente para el caso de las BZF de quercetina y kaempferol se calcularon las concentraciones de las BZF mediante una curva de calibración antes descrita (Figura 4).

Para determinar la capacidad citoprotectora de las BZF aisladas, se realizó el ensayo de liberación de LDH y el de reducción de MTT descritos en el punto 4.3.3. En este caso se ensayó la concentración efectiva 80 ( $CE_{80}$ ) para cada BZF que ha sido obtenida previamente de la evaluación de la capacidad antioxidante de estas moléculas aisladas.

A partir de los experimentos de evaluación de actividad antioxidante, se determinaron los valores de  $CE_{80}$  para cada BZF y se compararon con el  $CE_{80}$  del respectivo FL que la originó. El cociente entre ambos valores de  $CE_{80}$  genera un "índice de amplificación antioxidantes FL/BZF". Del mismo modo, usando los valores de  $CE_{80}$  para FLox y FL (que se obtienen en Obj. 2), se estimó, para cada flavonoide, un cociente FL/FLox, que se denomina "índice de amplificación antioxidantes FL/FLox".

## **4.7 Métodos relacionados a experimentos complementarios**

### **4.7.1. Análisis por Resonancia Magnética Nuclear de la BZF aislada derivada de la oxidación de quercetina (Q-BZF).**

Para realizar los análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , se disolvieron 5 mg de Q-BZF puro en 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{DMSO-}d_6$  y se transfirieron a tubos de RMN de 5 mm. Los datos espectrales de RMN se obtuvieron utilizando un espectrómetro Bruker Avance 400 (Bruker, Rheinstetten, Alemania) ( $^1\text{H}$  a 400 MHz y  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz). Los espectros se adquirieron a 300 °K, los cambios químicos y las constantes de acoplamiento son presentadas en ppm y Hz, respectivamente, los datos se procesaron utilizando un software TopSpin 3.2. Cabe destacar que a la Q-BZF fue la única BZF que se le pudo hacer análisis de RMN, ya que tenía un rendimiento de extracción que permitía generar los mg requeridos para este análisis con un número aceptable de extracciones desde Qox mediante HPLC semipreparativo.



#### **4.7.2. Comparación de la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) por las BZF derivadas de quercetina (Q-BZF) y kaempferol (KAEM-BZF), y sus respectivos flavonoides precursores.**

La activación de NF- $\kappa$ B se evaluó usando un kit ELISA NF- $\kappa$ B p65 (total) y la extracción nuclear previa de las células se realizó mediante un kit de extracción nuclear. Se incubaron células Caco-2 ( $2 \times 10^7$  células/frasco de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>) por 48 h hasta alcanzar una confluencia del 90%. Las células fueron tratadas con PBS o indometacina, en ausencia o presencia de Q-BZF, KAEM-BZF, QUE o KAEM durante 40 min. La cuantificación de NF- $\kappa$ B p65 se evaluó según instrucciones del kit midiendo la absorbancia a 450 nm.

#### **4.8 Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Prism V8 (GraphPad Software Inc., EEUU). Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Los datos se analizaron utilizando análisis de varianza (ANOVA) de una vía y como post-test, el test de Tukey para múltiples variables. Todos los datos para los gráficos de barra muestran la media  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas para valor  $p < 0,05$ . Los valores de  $p$  se muestran de la siguiente manera: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

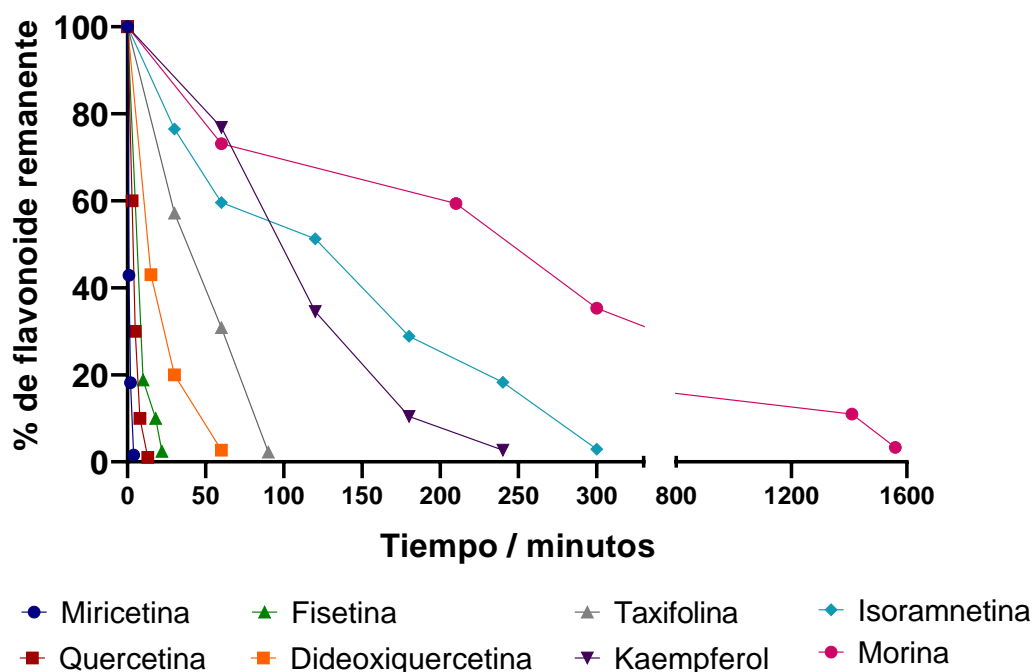
### 5.1 Resultados relacionados con el objetivo específico 1

#### 5.1.1. Oxidación de flavonoides

Con el fin de determinar la degradación oxidativa tiempo-dependiente de los flavonoides Q, MYR, FIS, DDQ, TAX, KAEM, ISO y MOR en medio alcalino (pH 12), fueron tomadas muestras a diferentes periodos de tiempo (desde 0 a 1560 min) para luego, ser inmediatamente acidificadas a pH 3,5 (por adición de tampón acetato de sodio) y posteriormente analizadas por HPLC. La figura 5 representa los perfiles de desaparición en el transcurso del tiempo de los ocho flavonoides en estudio. Como se ha dicho anteriormente, el proceso de oxidación se lleva a cabo hasta que el FL llega a una concentración remanente entre 2 a 4 %, determinada a la  $\lambda_{\max}$  específica de cada flavonoide, cuando esto ocurre las mezclas de metabolitos obtenidos tras la oxidación de un flavonoide se denominan como FLox.

El decaimiento en la concentración de los flavonoides se monitoreó a las longitudes de onda donde cada compuesto absorbe su máxima energía: para miricetina (370 nm), quercetina (370 nm), fisetina (360 nm), dideoxiquercetina (362 nm), taxifolina (288 nm), kaempferol (368 nm), isoramnetina (370 nm) y morina (354 nm). Los tiempos de retención ( $t_R$ ) de los

flavonoides en la corrida cromatográfica utilizada fueron: miricetina (34,8 min), quercetina (39,1 min), fisetina (34,8 min), dideoxiquercetina (40,7 min), taxifolina (32,1 min), kaempferol (43,1 min), isoramnetina (43,5 min) y morina (36,9 min).



**Figura 5. Degradación oxidativa tiempo-dependiente de flavonoides después de ser sometidos a un medio alcalino (pH 12).** Luego de solubilizar inicialmente cada flavonoide en álcali, las muestras incubadas durante varios periodos entre 0-1560 min a 25 °C para el caso de miricetina, quercetina, fisetina, dideoxiquercetina, taxifolina e isoramnetina, y a 40 °C en el caso de kaempferol y morina, se acidificaron e inmediatamente fueron analizadas por HPLC-DAD a la longitud de onda de absorción máxima para cada flavonoide. Los datos se presentan como los porcentajes remanentes de flavonoide en el tiempo hasta que su concentración esta entre 2-4%.

Como se muestra en la figura 5, a 25 °C, miricetina, seguida de quercetina y fisetina, fueron los tres flavonoides de descomposición más rápida, ya que desaparecieron por completo después de 4, 13 y 22 min, respectivamente. Dideoxiquercetina y taxifolina e isoramnetina sufrieron una descomposición comparativamente más lenta total en 60, 90 y 300 min (5 h). Finalmente, kaempferol y morina necesitaron de un aumento en la temperatura en el proceso de oxidación hasta 40 °C, para exhibir una desaparición total a 240 (4 h) y 1560 (26 h) min, ya que a temperatura ambiente (25 °C) kaempferol tardaba más de 8 horas de oxidación y morina tardaba más de 48 horas, lo cual dificultaba la logística de los experimentos.

Se presentan amplias diferencias en los tiempos necesarios para oxidar completamente cada flavonoide y formar el respectivo FLox. Se observó que los flavonoides de desaparición más rápida (MYR, Q, FIS y DDQ) compartían las siguientes características estructurales: grupos hidroxilo en los carbonos 3' y 4' del anillo B (grupo catecol), un doble enlace entre C2-C3, un grupo hidroxilo en C3 y un carbonilo en C4 en el anillo C. Comparativamente, las moléculas que no exhiben grupos catecoles (es decir, KAEM y MOR) experimentaron una desaparición sustancialmente más lenta. MOR exhibe grupos hidroxilo en las posiciones 2' y 4' del anillo B (grupo resorcinol) y tarda 120 veces más en oxidarse que Q, apoyando la noción de que la configuración de catecol favorece la velocidad de oxidación. Se revela la importancia particular del residuo hidroxilo en la posición 3' ya que su *o*-metilación se

asoció con un tiempo de oxidación 20 veces mayor (ISO versus Q). Se encontró que la presencia de un grupo hidroxilo adicional en la posición 5' del anillo B formando un grupo pirogalol (como en MYR) se traduce en una desaparición total sustancialmente más rápida. Los resultados aquí descritos están en concordancia con lo reportado por Atala *et al.*, 2017.

Para iniciar el proceso de oxidación de un flavonoide que posee un grupo catecol en el anillo B, se elimina un electrón o un átomo de hidrógeno de uno de sus grupos hidroxilo en este anillo. Este proceso crea un radical fenoxilo que luego se transforma en un intermedio de o-semiquinona. La estabilidad de este último tipo de especie se puede atribuir al establecimiento de enlaces de hidrógeno entre el oxígeno del grupo hidroxilo vecinal y la especie (lo que podría explicar potencialmente la rápida desaparición de MYR) o a la propagación de la carga del electrón desapareado a través de la resonancia. a través del anillo C y finalmente al anillo A. La presencia de un doble enlace entre C2-C3 y un hidroxilo en C3 en el flavonoide parece facilitar la oxidación ya que permite la planaridad y la estabilización del radical fenoxilo resonante a través del enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo adyacente. Además, permite la formación de tautómeros de la o-quinona que surgen de la oxidación electroquímica del grupo catecol (Atala *et al.*, 2017). De hecho, el flavonoide taxifolina, que carece de dicho enlace, experimentó una oxidación inducida por álcali siete veces más lenta que la quercetina. Estas características estructurales que determinan la susceptibilidad de un

flavonoide al ser expuesto a oxidación, también serán las que determinen el potencial antioxidante para la eliminación efectiva de ROS.

Átala *et al.* (2017) investigaron el impacto de la oxidación en las capacidades de eliminación y reducción de ROS de la quercetina y otros 13 flavonoides estructuralmente similares, utilizando los ensayos ORAC, Folin-Ciocalteu y Fe-Triazine. Sus hallazgos mostraron que las mezclas de metabolitos producidas a partir de estas oxidaciones conservaron una parte significativa de las propiedades antioxidantes de los precursores, en lugar de perderlas como se esperaba. Este fenómeno se observó independientemente del método de oxidación utilizado, ya sea inducido por álcali o mediado por tirosinasa fúngica. Específicamente, las mezclas de oxidación de nueve de los 14 flavonoides probados, incluidos flavanoles, flavonoles, flavonas y flavanonas, exhibieron actividades residuales de eliminación de ROS superiores al 70 %, mientras que los 14 flavonoides conservaron más del 50 % de sus propiedades reductoras originales.

El estudio mencionado no determinó la composición química de los metabolitos en cada mezcla de oxidación. Sin embargo, los investigadores creen que el proceso de oxidación no alteraría significativamente los componentes estructurales responsables de las propiedades de eliminación y reducción de ROS de los flavonoides. Estos componentes estructurales pueden incluir grupos fenólicos que pueden estabilizar ROS y reducir el reactivo de Folin-Ciocalteu o  $\text{Fe}^{+3}$ . No obstante, otras características

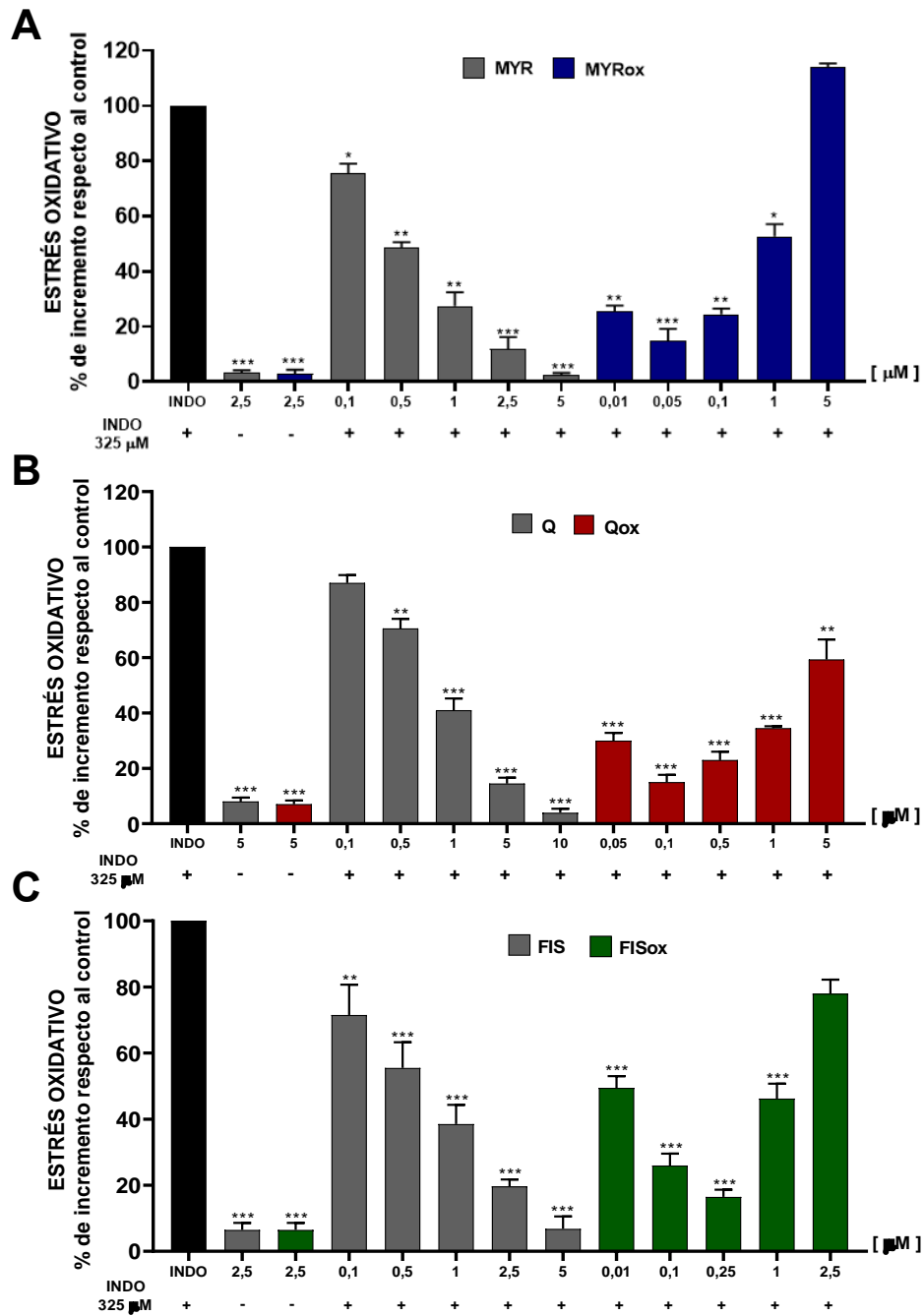
estructurales que podrían promover la estabilización de los radicales fenoxi resultantes, como grupos funcionales que permiten la resonancia y la deslocalización de electrones, también pueden existir en la estructura de los supuestos metabolitos de oxidación (Speisky *et al.*, 2022).

Ahora pondremos a prueba a los FLox generados evaluando si tienen la capacidad de perder, retener o amplificar la actividad antioxidante en comparación con las moléculas originales no sometidas a oxidación.

## **5.2 Resultados relacionados con el objetivo específico 2**

### **5.2.1. Comparación de la capacidad antioxidante celular de las mezclas FLox versus la de sus respectivos flavonoides de origen**

Para continuar con el estudio de la posible retención en la capacidad antioxidante celular tras someter a oxidación a determinados flavonoides, se comparó la capacidad de las mezclas FLox obtenidas anteriormente frente a sus flavonoides originales para proteger a células contra el aumento del estrés oxidativo inducido por el AINE, indometacina. La capacidad antioxidante celular de MYR, Q, FIS, DDQ, TAX, KAEM, ISO y MOR y sus respectivos FLox frente al daño oxidativo inducido por indometacina fue medido en células Caco-2 (Fig. 6. 7 y 8)



**Figura 6.** Comparación de los efectos antioxidantes de los flavonoides y su respectiva mezcla obtenida tras la oxidación completa frente al aumento del estrés oxidativo intracelular inducido por indometacina a 325  $\mu$ M: (A) miricetina (MYR) y MYRox. (B) miricetina (Q) y Qox. (C) fisetina (FIS) y FISox. Los datos se presentan como media  $\pm$  D.S. \*,  $p < 0,05$ . \*\*,  $p < 0,01$ . \*\*\*,  $p < 0,001$ , respecto a INDO. ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.



Como se puede observar, el 100% del valor corresponde al aumento del estrés oxidativo inducido por indometacina a una concentración de 325  $\mu\text{M}$ . Todos los flavonoides exhiben efectos protectores en las células en forma de concentración-respuesta en rangos de concentración similares (0,1-10  $\mu\text{M}$ ). Se describen las  $\text{CE}_{80}$  de los FL y su respectivo FLox, frente al aumento en el tono oxidativo intracelular inducido por INDO para estandarizar los resultados y para establecer comparaciones adecuadas entre sí.

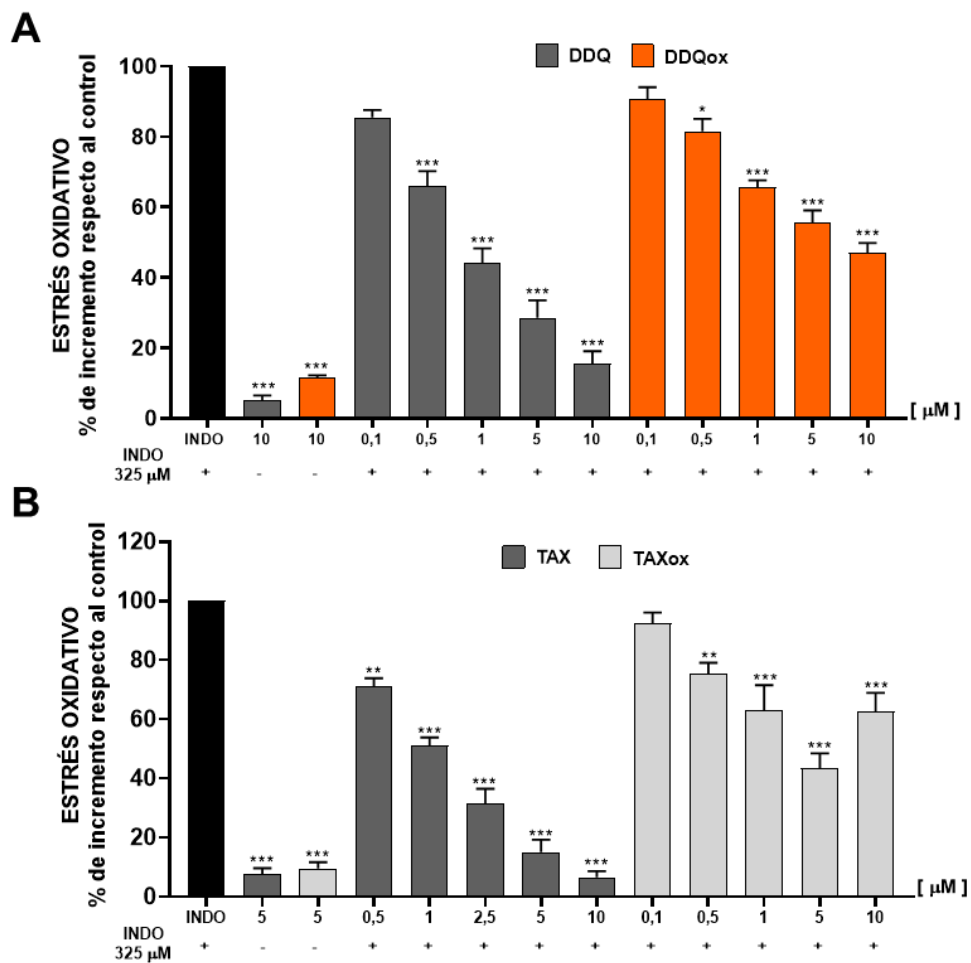
Cuando cada flavonoide se coincuba por 40 min en células en presencia de indometacina, se observa una protección del 80 % a las siguientes concentraciones ensayadas por separado: MYR a 2,5  $\mu\text{M}$  (Fig. 6A); Q a 5  $\mu\text{M}$  (Fig. 6B); FIS a 2,5  $\mu\text{M}$  (Fig 6C); DDQ a 10  $\mu\text{M}$  (Fig 7A); TAX 5  $\mu\text{M}$  (Fig 7B); KAEM a 5 $\mu\text{M}$  (Fig. 8A); ISO a 5 Mm (Fig. 8B); y MOR 7,5 Mm (Fig. 8C). En ausencia de indometacina, los flavonoides ensayados a su  $\text{CE}_{80}$  no produjeron un aumento significativo del estrés oxidativo.

Ahora, cuando se testeó cada FLox en las células expuestas a ROS, se logró el mismo efecto protector (80%) a una concentración mucho más baja para 6 de los 8 flavonoides, reflejando un incremento en la potencia antioxidante al oxidar el flavonoide. Este fue el caso de MYRox (Fig. 6A) ejerciendo el nivel de protección descrito a 0,05  $\mu\text{M}$ ; Qox a 0,1  $\mu\text{M}$  (Fig. 6B); FISox a 0,25 Mm (Fig. 6C); KAEMox a 0,05  $\mu\text{M}$ (Fig. 8A); ISORox a 0,1  $\mu\text{M}$  (Fig. 8B) y MORox a 0,5  $\mu\text{M}$ (Fig. 8C). Como los FLox son un conjunto de varios metabolitos, para poder asignar una concentración de comparación, se

estiman concentraciones equivalentes en base a la cantidad

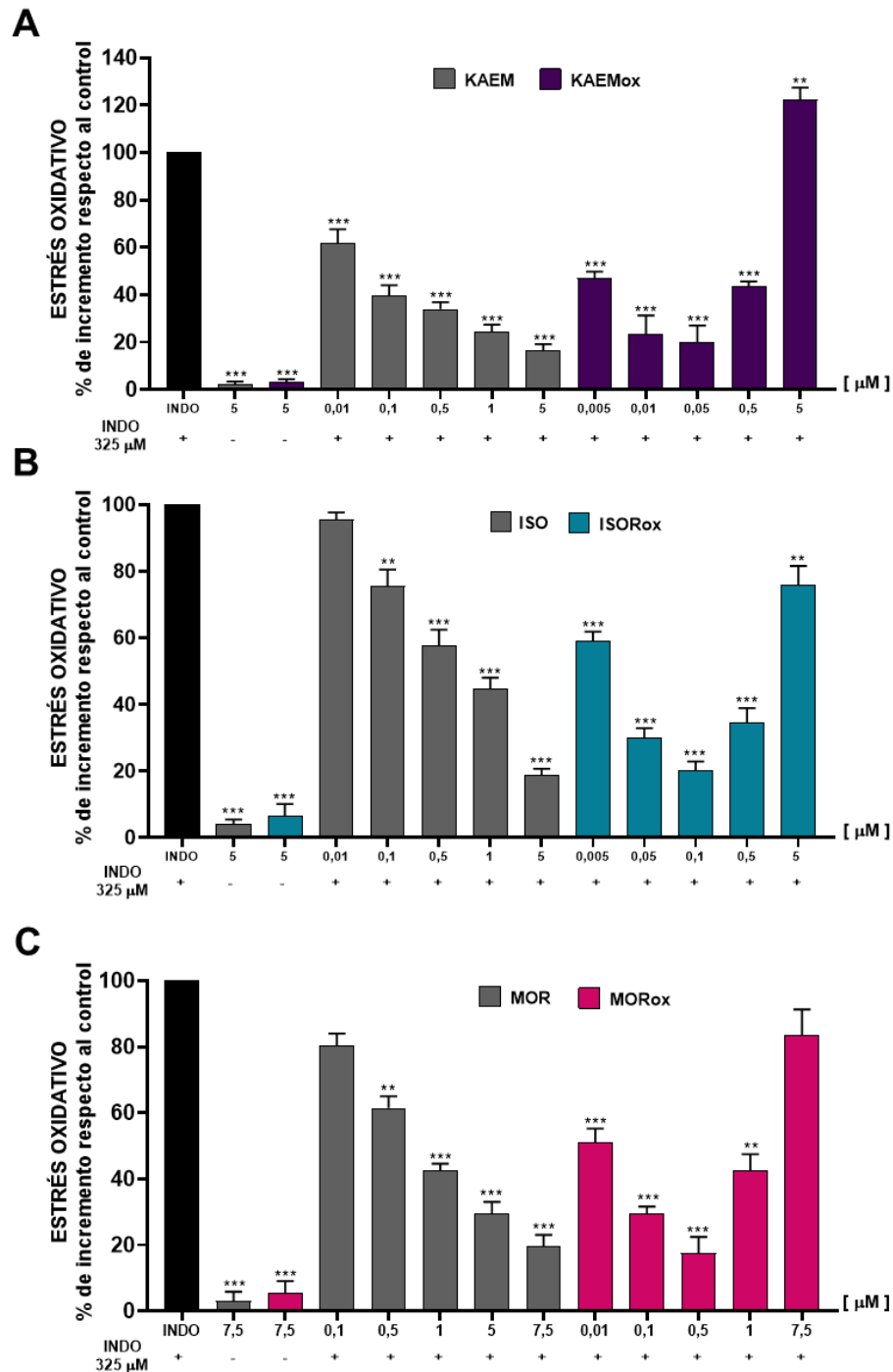
de flavonoide que inicialmente fue expuesto a oxidación considerando las diluciones necesarias a partir de él que se realizaron para testear en células.

Por ende, las CE<sub>80</sub> definidas anteriormente para los FLox corresponden a concentraciones denominadas como equivalentes.



**Figura 7.** Comparación de los efectos antioxidantes de los flavonoides y su respectiva mezcla obtenida tras la oxidación completa frente al aumento del estrés oxidativo intracelular inducido por indometacina a 325 μM: **(A)** dideoxiquercetina (DDQ) y DDQox. **(B)** taxifolina (TAX) y TAXox. Los datos se presentan como media ± D.S. \*, p < 0,05. \*\*, p < 0,01. \*\*\*, p < 0,001, respecto a INDO. ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Por otra parte, los FLox de DDQ y TAX (Fig. 7) no mostraron aumentar ni retener la capacidad antioxidante exhibida inicialmente por el flavonoide. DDQox a una concentración de 10  $\mu$ M protegió un 50% del daño oxidativo a las células, pero al ir disminuyendo en concentraciones hasta 0,1  $\mu$ M se pierde totalmente el efecto observado (Fig 7A). TAXox ensayado en células a 5  $\mu$ M de concentración demuestra proteger un 60%, pero al ir decreciendo en concentración este efecto no sólo se pierde si no se vuelve prooxidante, aumento el estrés oxidativo ya producido por indometacina (Figura 7B.). Estas concentraciones de FLox descritas fueron ensayadas en ausencia del inductor de estrés oxidativo y ninguna de ellas aumento significativamente el nivel de daño.



**Figura 8.** Comparación de los efectos antioxidantes de los flavonoides y su respectiva mezcla obtenida tras la oxidación completa frente al aumento del estrés oxidativo intracelular inducido por indometacina a 325  $\mu\text{M}$ : (A) dideoxiquercetina (DDQ) y DDQox. (B) taxifolina (TAX) y TAXox. Los datos se presentan como media  $\pm$  D.S. \*,  $p < 0,05$ . \*\*,  $p < 0,01$ . \*\*\*,  $p < 0,001$ , respecto a INDO. ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Entendemos al estrés oxidativo como “un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, que conduce a una interrupción de la señalización y el control redox y/o daño molecular” (Sies *et al.*, 2020). Biológicamente como tal, no es posible cuantificarlo, pero como un enfoque experimental para estimar indirectamente un cambio en el desequilibrio a favor de los oxidantes, se ha utilizado aquí el incremento en la fluorescencia que resulta de la oxidación intracelular de la sonda diclorodihidrofluoresceína reactiva a ROS. Ha sido descrito que un aumento en la oxidación de la diclorodihidrofluoresceína puede interpretarse como un indicador de estrés oxidativo (Chen *et al.*, 2010).

Según lo informado por Carrasco-Pozo *et al.* en 2011 y Sandoval-Acuña *et al.* en 2012, se cree que los AINE causan daño a las células del epitelio gastrointestinal al inducir disfunción mitocondrial. Esta disfunción incluye la inhibición de los complejos mitocondriales I y III, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, reducción del consumo de oxígeno y disminución del ATP intracelular. El daño celular resultante está altamente correlacionado con la generación significativa de ROS, como afirman Tomita *et al.* en 2014.

Los resultados descritos en este punto demuestran que para ciertos flavonoides el proceso de oxidación resulta favorecedor en cuanto a su capacidad antioxidante, y para otros, la degradación oxidativa merma dicha capacidad. Interesantemente para los FLox que exhiben una eficacia antioxidante en algún determinado rango de concentraciones equivalentes

como MYRox, Qox, FISox, KAEMox, ISORox, MORox, dicha eficacia comienza a decaer a concentraciones equivalentes superiores, e incluso en algunos casos (MYRox, Qox, KAEMox) se llega a sobrepasar el nivel de estrés oxidativo inducido por indometacina. Este comportamiento bifásico que ejercen los FLox se conoce como parahormesis (Forman *et al.*, 2014), y podría interpretarse como un indicio de que dentro de su composición se incluirían, uno o más moléculas que, en un rango bajo de concentraciones, son capaces de desencadenar efectos antioxidantes, pero que más allá de las concentraciones en las que FLox producen sus efectos antioxidantes máximos, tales moléculas comenzarían a comportarse como pro-oxidantes. Esto estará en estrecha relación con los metabolitos (y su proporción) que se produzcan dentro de cada mezcla FLox y además de como estos nuevos compuestos generados son capaces de reaccionar frente a una situación de estrés oxidativo inducido en células.

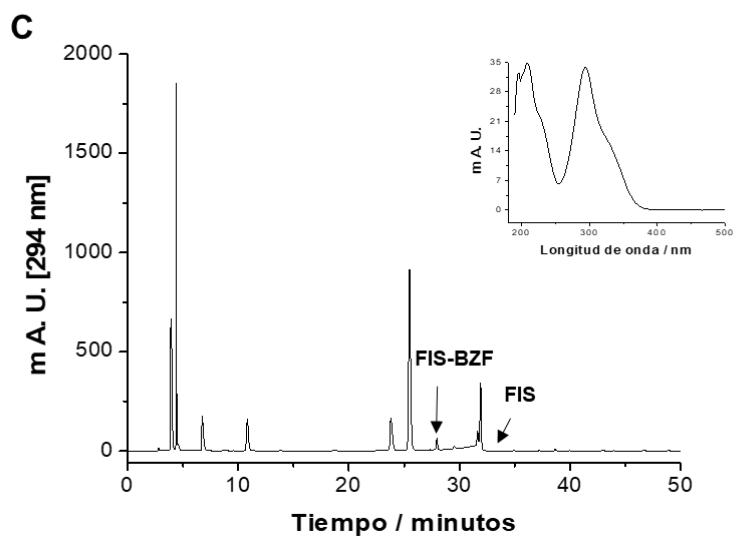
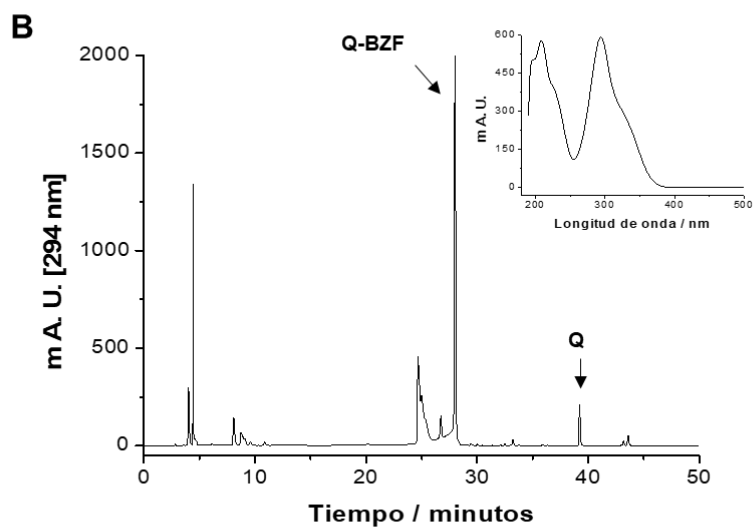
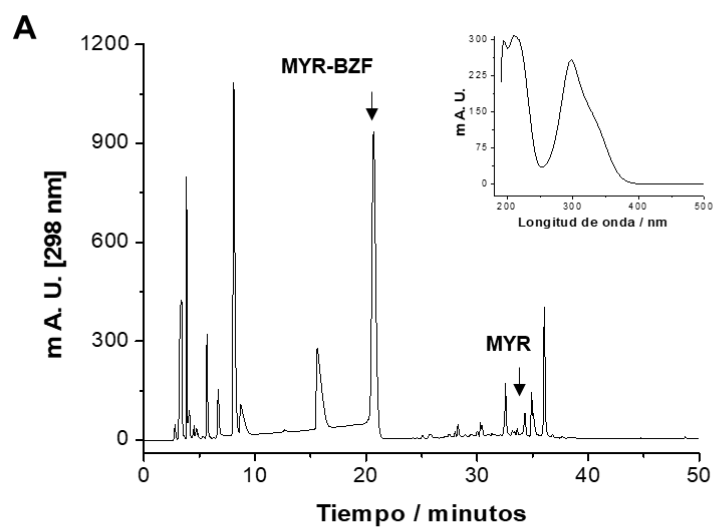
Dado los antecedentes respecto a la notable retención e incluso amplificación de la capacidad antioxidante por parte del metabolito tipo benzofuranona obtenido tras la oxidación de quercetina descrito en Fuentes *et al.*, 2017), este trabajo se centra en la búsqueda de este tipo de metabolito obtenido tras degradación oxidativa de los ocho flavonoides en las condiciones aquí precisadas en el punto 5.1.

### **5.3 Resultados relacionados con el objetivo específico 3**

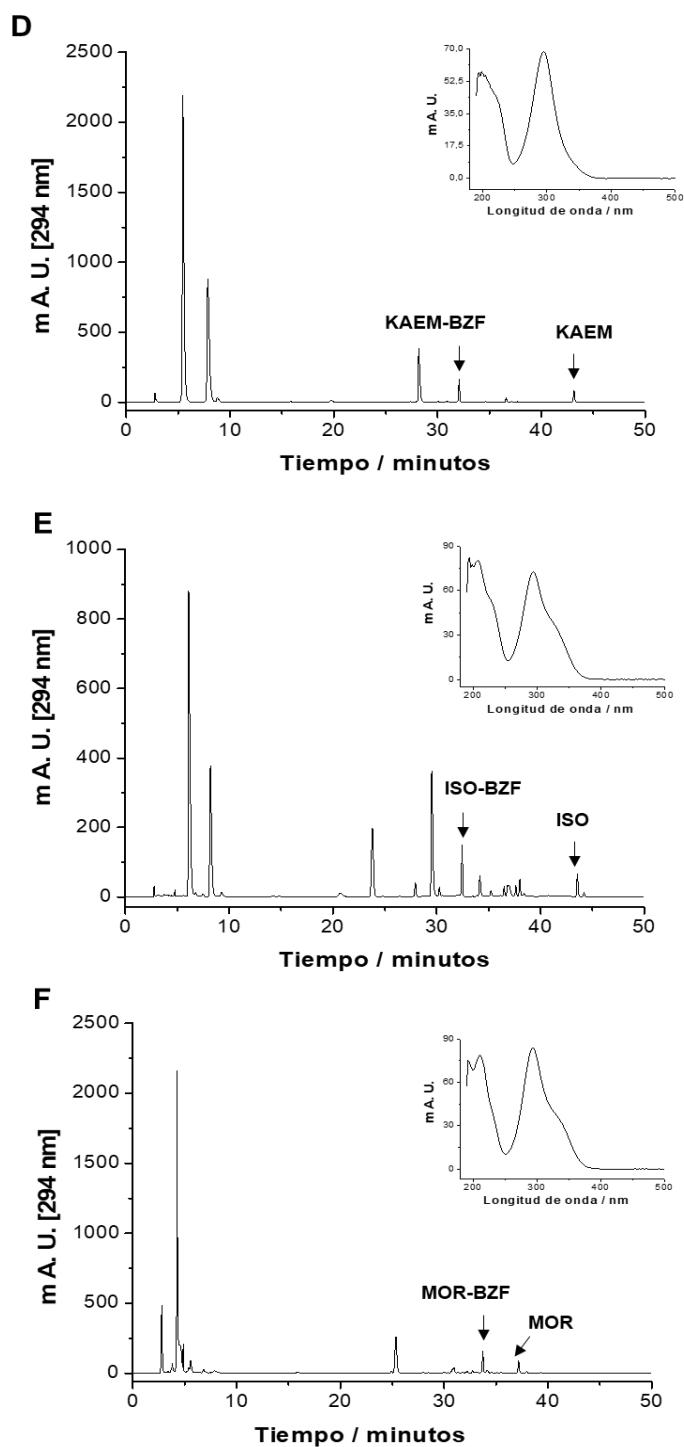
#### **5.3.1. Búsqueda, aislamiento e identificación de las BZF**

Una muestra de cada uno de los ocho FLox en estudio se sometió a análisis por HPLC-DAD para buscar la presencia del derivado BZF en su composición. Son necesarios dos requisitos que debe cumplir los peaks candidatos a contener a la BZF: el peak debe tener correspondencia con el rango de longitud de onda reportado para las BZF, que es de 288-298 nm, y una forma característica de su espectro de absorción (Jungbluth & Ternes, 2000). En la figura 6 se muestran los 6 cromatogramas y en cada uno de ellos se indica el peak que tuvo las características de la respectiva BZF (↓). Cada cromatograma tiene un inserto que refleja el espectro de absorción de ese peak.

En el caso de MYRox (Fig. 9A), el peak putativo a contener la BZF eluye a un tiempo de retención ( $t_R$ ) de 20,6 min y tiene como máximo de absorción ( $\lambda_{max}$ ) 298 nm. Para Qox (Fig. 9B) el peak que contiene la BZF eluye a un  $t_R$  de 27,8 min y su  $\lambda_{max}$  es 294 nm. En FISox (Fig. 9C) el peak candidato eluye  $t_R$  27,9 min y su  $\lambda_{max}$  es 294 nm. El  $t_R$  del peak candidato a ser la BZF en KAEMox (Fig. 9D) eluye a 31,9 min y su  $\lambda_{max}$  es 294 nm, en ISORox (Fig. 9E) este peak eluye a los 32,5 min y su  $\lambda_{max}$  es 294 nm. Finalmente, en MORox (Fig. 9F) en peak putativo a poseer la BZF eluye en  $t_R$  33,5 min.





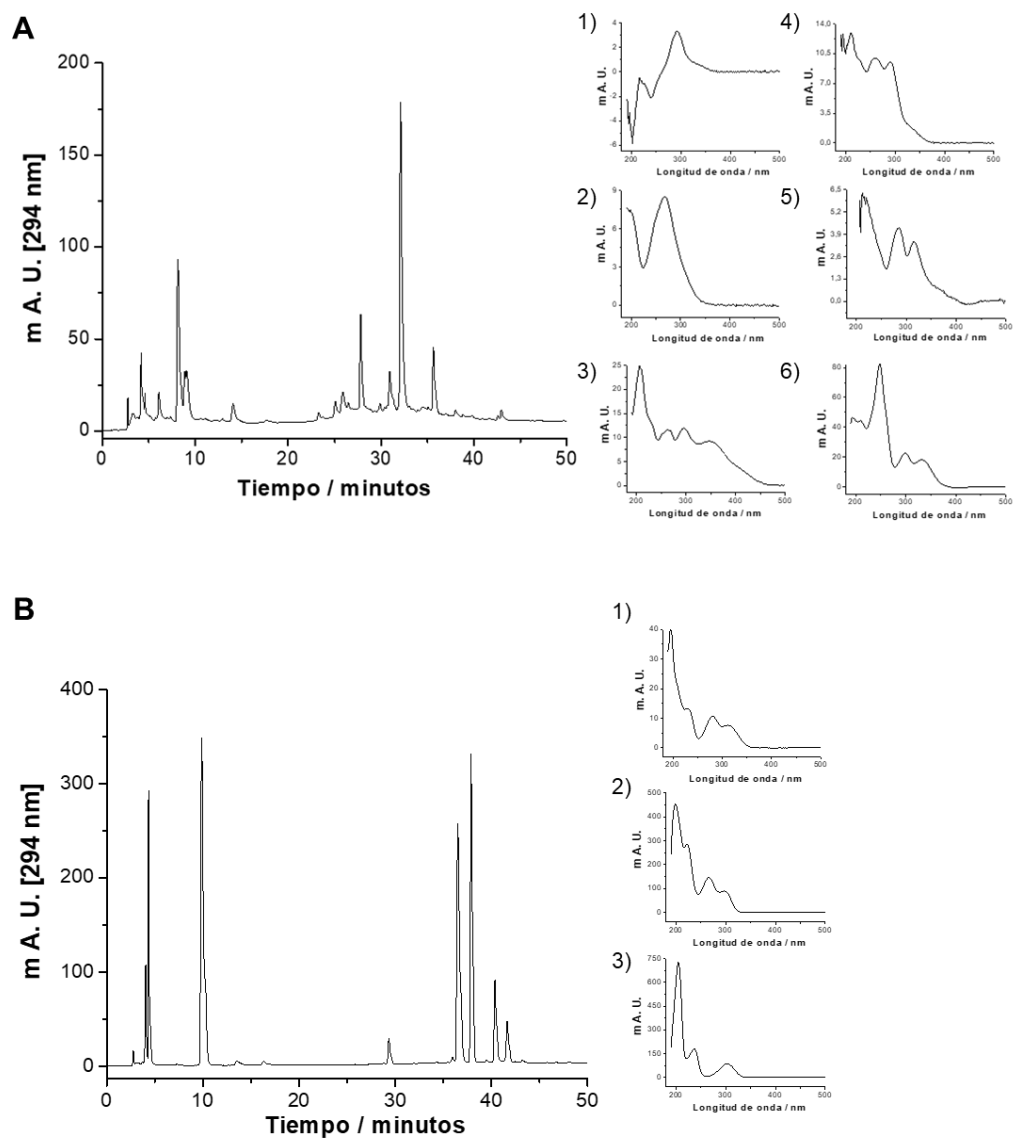


**Figura. 9. Cromatogramas resultantes del análisis HPLC-DAD de mezcla oxidativa de flavonoides (FLOx): (A) MYRox, (B) Qox, (C) FISox, (D) KAEMox, (E) ISORox; (F) MORox. En cada cromatograma se indica el lugar de elución del peak que contiene el BZF y se presenta un inserto con el espectro de absorción UV del peak asociado a la respectiva BZF.**

y su  $\lambda_{\max}$  es 294 nm. El espectro de absorción de estos peaks anteriormente descritos coinciden con los espectros reportados para las BZF derivadas de miricetina, quercetina, fisetina, kaempferol y morina (Jungblunt & Ternes, 2000). Además,  $\lambda_{\max}$  del peak candidato a contener la BZF de quercetina y kaempferol coincide con lo anteriormente descrito para estas 2 BZF aisladas (Jørgensen et al., 1998).

La Figura 10 muestra los cromatogramas HPLC-DAD de las mezclas TAXox y DDQox. En el caso de TAXox (Fig 8A), ninguno de los 6 peaks señalados en el cromatograma respectivo corresponde en forma del espectro de absorción ni en máximo de longitud de onda a una BZF ( $t_{R1}$  23,6 min;  $t_{R2}$  25,7 min;  $t_{R3}$  26,2 min;  $t_{R4}$  27,1 min;  $t_{R5}$  30,1 min;  $t_{R6}$  31,5 min).

Al no encontrar un candidato consistente con el metabolito tipo BZF La oxidación electroquímica de taxifolina bajo atmósfera inerte de argón no mostró la formación de un derivado de benzofuranona, ya que las propiedades redox se ven afectadas por su estructura específica, que no permite la deslocalización de electrones a través de toda la estructura del flavonoide (Kocabova et al., 2016). La oxidación electroquímica de la taxifolina dio lugar a la formación de derivados de quinona y la posterior hidroxilación de estos derivados (ANEXO 1), generó compuestos llamados de estructura abierta (por la ruptura del núcleo flavan) como lo son el ácido 2,4,6-trihidroxifenil oxoacético, 3,4-dihidroxibenzaldehído, ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico, entre otros (Sokolova et al., 2016). Otro antecedente publicado recientemente,



**Figura 10.** Cromatogramas resultantes del análisis HPLC-DAD de mezcla oxidativa de flavonoides (FLox): **(A)** TAXox, **(B)** DDQox. En cada cromatograma se muestran los espectros de absorción de cada peak que están en la zona de elución de la benzofuranona.

describe que TAX produce dos peaks de oxidación electroquímica analizados mediante voltagramas, el primero se atribuye a la formación del intermedio o-quinona y el segundo peak de oxidación se asigna a la oxidación del resto resorcinol del anillo A, esto último fue desprendido de la comparación de los peaks de oxidación entre TAX y Q (Heřmánková *et al.*, 2019). Dado los antecedentes anteriormente descritos en otras metodologías de oxidación y sumado a que taxifolina no cumple con los requerimientos propuestos en la hipótesis de este trabajo para formar una BZF tras ser sometido a oxidación (no posee un doble enlace entre C2-C3) se descarta la formación de la BZF derivada de este flavonoide en las condiciones aquí ensayadas, además la capacidad antioxidante de TAX oxidada no muestra un indicio que haga pensar que se forma un metabolito capaz de retener o amplificar dicha capacidad.

Por otra, parte al analizar el cromatograma de DDQox (Fig. 10B), se observa que de los 3 peaks ( $t_{R1}$  29,3 min;  $t_{R2}$  37,1 min;  $t_{R3}$  38,4 min) que podrían contener a la BZF ninguno cumple con los requerimientos antes descritos de forma y máximo del espectro de absorción de una BZF. No hay antecedentes sobre el proceso de oxidación de DDQ ni sobre la formación del correspondiente derivado BZF de este flavonoide. Dado que, según lo planteado en la hipótesis de esta tesis, DDQ tras ser sometida a oxidación debería formar su respectiva BZF, los tres peaks generados tras la oxidación de dicho FL que se describen anteriormente, de todos modos, se someterán a análisis por espectrometría de masas para elucidar certeramente si se

encuentra o no este metabolito en la mezcla DDQox.

Se sometió a análisis a través de HPLC-DAD-ESI-MS/MS a todos los peaks presentes en los FLox estudiados que según análisis de HPLC-DAD son candidatos putativos a contener a las BZF derivadas de miricetina, quercetina, fisetina, kaempferol, isoramnetina y morina; con el fin de determinar la presencia de una estructura química que atribuible a una BZF. Para ello a través del HPLC acoplado a un colector de fracciones automatizado se aislaron los peaks correspondientes, se secaron mediante evaporador rotario a 40 °C y luego se reconstituyeron en la misma composición de fase móvil del tiempo en el que eluyen para ser inyectados al HPLC-DAD-ESI-MS/MS. La búsqueda de las BZF se realizó en modo negativo, ya que es como ha sido reportado el hallazgo de la BZF para otros FL como quercetina, miricetina, fisetina, kaempferol, morina, ramnazina y ramnetina (Jørgensen et al., 1998; Jungblunt y Ternes., 2000; Zhou y Sadik, 2008; Ramešová *et al.*, 2014; Ramešová *et al.*, 2015; Ramešová *et al.*, 2017).

El valor de  $m/z$  que fue buscado para cada BZF corresponde a 16 unidades más que su peso molecular, ya que el FL en el proceso de oxidación sufre una pérdida de 2 átomos de hidrogeno y una subsiguiente incorporación de una molécula de agua, en base a lo hallado para Q-BZF en Fuentes *et al.*, 2017.

Se realizó una primera inyección en modo SCAN (sin fragmentar) que permitio conocer todos los valores de  $m/z$  presentes en la fracción y entrega el

valor de  $m/z$  correspondiente al ion padre  $[M-H]^-$ . Luego de una segunda inyección en modo Product Ion Scan (PIS), se realizó la fragmentación del ion padre, donde se obtuvieron los fragmentos generados para este ion. Para finalizar una tercera inyección de validación en modo Multiple Reaction (MRM), asociando este ion molecular  $[M-H]^-$  con cada uno de los fragmentos encontrados, esto se hizo para confirmar que la condición particular de cada  $m/z$  de  $[M-H]^-$  y su fragmento, se corresponde con el tiempo de retención. Estos cromatogramas se muestran en el ANEXO II.

Para el peak de  $t_R$  20,6 min aislado desde MYRox se encuentra el valor de  $m/z$  de  $[M-H]^-$  es 333,1, que fue lo esperado según el peso molecular de miricetina (318 g/mol). Anteriormente se había reportado la formación de la BZF de este FL, pero no se logró aislar (debido a su gran inestabilidad) para analizarla por espectrometría de masas (Jungblunt y Ternes, 2000). Los fragmentos detectados desde el ion molecular 333,1 son 125,0/190,9.

El valor  $m/z$  de  $[M-H]^-$  del peak candidato a contener la BZF de quercetina desde Qox (eluyendo a  $t_R$  27,8 min) fue 317,0; y los valores  $m/z$  de los fragmentos mayoritarios de este peak fueron 163,1/191,0, ambos fragmentos coinciden con lo reportado para el ion molecular 317 de la BZF de quercetina (Zhou y Sadik, 2008).

Para el peak candidato aislado desde FISox ( $t_R$  27,9 min), se obtiene que el valor de  $m/z$  para  $[M-H]^-$  es de 301,0, que corresponde a lo reportado previamente, además para los fragmentos encontrados, dos de ellos ( $m/z$

190,9 y 135,2) también han sido reportados como pertenecientes a la FIS-BZF (Jungblunt y Ternes, 2000; Ramešová *et al.*, 2015).

El peak putativo ( $t_R$  31,9 min) aislado desde KAEMox tuvo un valor  $m/z$  para el  $[M-H]^-$  de 301,1, que es el mismo reportado para la KAEM-BZF (Jungblunt y Ternes, 2000). Los fragmentos encontrados para este ión molecular fueron: 245,1/273,1/151,1/206,9, coincidiendo el 273,1 con lo reportado por Jungblunt y Ternes, 2000.

En ISORox para el peak eluído a  $t_R$  32,5 min fue encontrado un valor  $m/z$  del ión  $[M-H]^-$  de 331,1 y como fragmentos de él los  $m/z$ : 303,1/275,1/207,0/123,0. A la fecha en literatura, no hay reportes de formación ni identificación de la benzofuranona proveniente del flavonoide isoramnetina para comparar. Sin embargo, el valor del ión molecular es el esperado según el peso molecular del flavonoide de origen y el fragmento de valor 207 se repite en las fragmentaciones de las BZF de kaempferol y morina, encontrándose un fragmento para estas BZF. Es la primera vez que se reporta el hallazgo de este compuesto tras la oxidación del respectivo flavonoide.

Para el FLox de MOR (MORox) el  $m/z$  encontrado para  $[M-H]^-$  a los 33,5 min de elución corresponde a un valor de 317,0 con fragmentos de 207,1/190,9/163,1/153,0. De estos fragmentos, los dos descritos primero se condicen con los que ya han sido reportados en literatura para la BZF derivada de morina (Jungblunt y Ternes, 2000).

De esta manera se establece la presencia e identidad de las BZF

generadas tras la oxidación en medio alcalino de miricetina, quercetina, fisetina, kaempferol, isoramnetina y morina.

Por último, el análisis de los 3 peaks provenientes de DDQox reveló que ninguno de ellos posee una molécula consistente con la BZF derivada de dideoxiquercetina. El peak de  $t_R$  29,1 min tiene un valor de  $m/z$  del  $[M-H]^-$  de 259,0. El peak de  $t_R$  37,1 min tiene un valor de  $m/z$  del  $[M-H]^-$  de 275,0 y el peak de  $t_R$  38,5 min tiene un valor de  $m/z$  del  $[M-H]^-$  de 409,1. El valor  $m/z$  del ión molecular buscado para esta BZF es 285 y ningún peak cumple con este requisito, por ende, se descarta la formación de la BZF de DDQ en estas condiciones experimentales. Un reciente reporte aporta evidencia sobre los efectos de la hidroxilación del anillo A, que está ausente en DDQ. Se sintetiza un derivado de la molécula de quercetina que tiene bloqueados los hidroxilos de la posición 5 y 7 del anillo A, tras someter a oxidación electroquímica este derivado, no se evidencia la formación de BZF (Heřmánková *et al.*, 2019). Sin embargo, bajo otras condiciones de oxidación, como lo son pH 2 y en presencia de ácido nitroso (condiciones que asemejan lo que ocurre en la cavidad oral tras la ingesta en conjunto de alimentos ricos en nitritos y alimentos ricos en flavonoles), se ha evidenciado la conversión de 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosido de quercetina en su respectiva Q-BZF glucosilada, demostrando que a pesar de tener unido un glucósido al grupo hidroxilo en posición 7 del anillo A de quercetina no es impedimento para, tras la oxidación, formar el correspondiente derivado BZF que además mantiene el glucósido

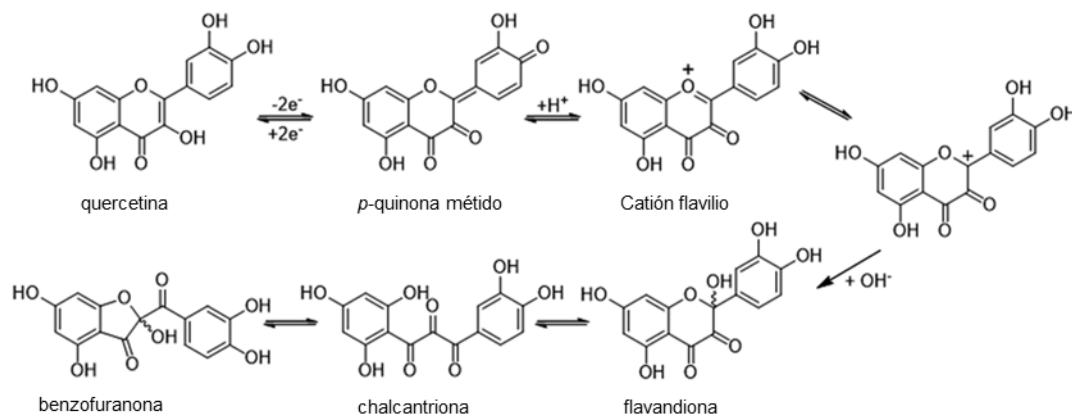


unido a su estructura (Morina *et al.*, 2015). Esto lleva a replantear el papel que juegan dichos hidroxilos en el anillo A, que hasta ahora creíamos sin influencia sobre la formación de BZF tras someter a oxidación a determinados flavonoides.

La oxidación de la quercetina, flavonoide el cual este proceso ha sido ampliamente investigado desde un punto de vista químico y comprende estudios en los que su oxidación ha sido inducida químicamente (Krishnamachari *et al.*, 2002; Makris *et al.*, 2002; Zenkevich *et al.*, 2007; Gulsen *et al.*, 2007), electroquímicamente (Jørgensen *et al.*, 1998; Bret *et al.*, 2003; Sokolová *et al.*, 2012) y enzimáticamente (Zhou y Sadik, 2000; Makris *et al.*, 2002; Kubo *et al.*, 2004). Se ha informado que, independientemente del modo experimental utilizado para inducir su oxidación, siempre se forma un conjunto esencialmente similar de metabolitos (Zhou y Sadik, 2008). Estos metabolitos formados comprenden: ácido protocatecuico e isómeros, ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico, ácido 2-oxo-2-(2,4,6-trihidroxifenilacetico, ácido 2-((3,4-dihidroxibenzoil)oxi)-4,6-dihidroxibenzoico, quecertina y sus isómeros, entre otros.

En 2017, Fuentes *et al.*, propusieron un mecanismo para la conversión de Q a Q-BZF. Sugieren que la oxidación de dos electrones de Q crea un intermedio p-quinona-metido que, tras la protonación, se transforma en un catión flavilio. Luego, este catión sufre una rápida hidratación, lo que resulta en la formación de 2,5,7,3',4'-pentahidroxi-3,4-flavandiona. Después de un

equilibrio tautomérico, se produce un intermedio de 2,3,4-chalcantriona, que finalmente se convierte en un metabolito polar identificado como 2-(3,4-dihidroxibenzoil)-2,4,6-trihidroxi-3(2H)-benzofuranona, o Q-BZF (Fig. 11).



**Figura 11.** Secuencia de estructuras químicas y reacciones propuestas que están involucradas en la conversión oxidativa de quercetina a Q-BZF (extraído de Fuentes et al., 2017).

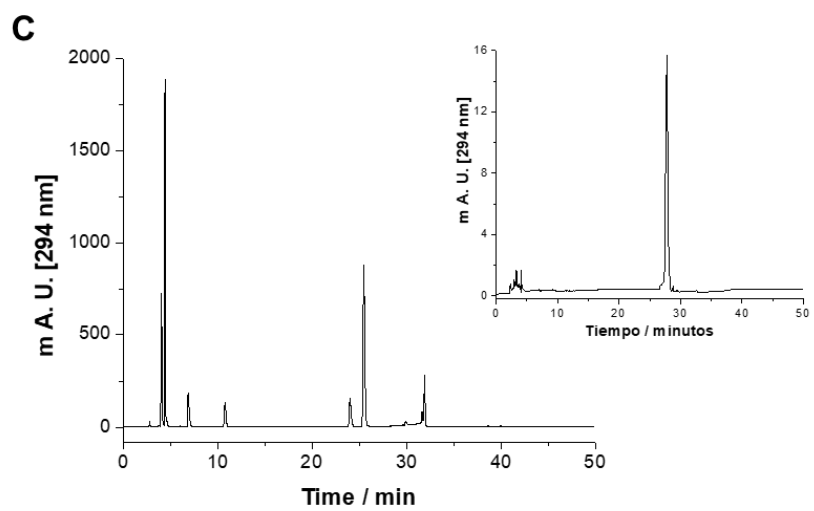
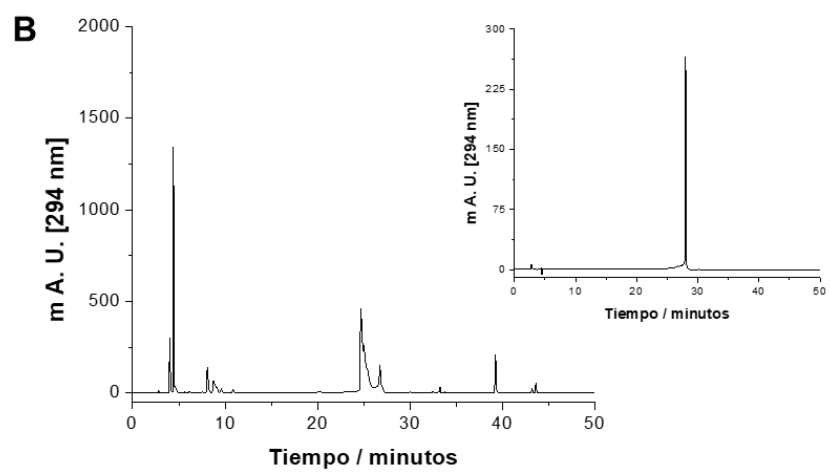
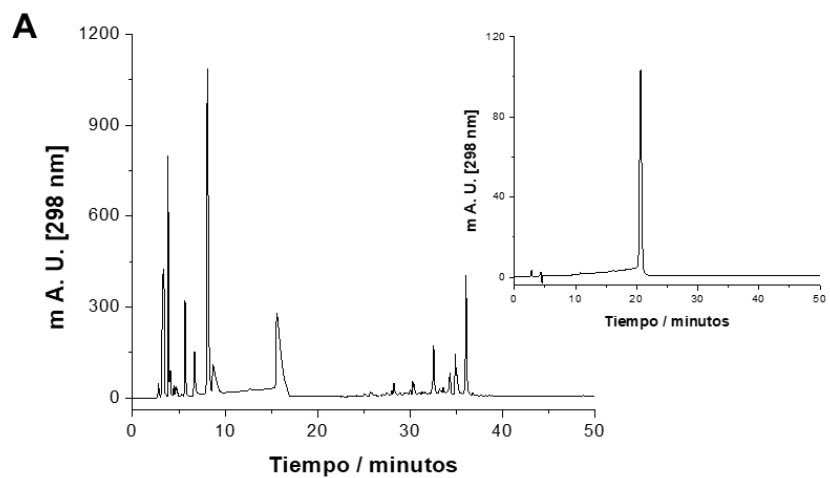
Se ha informado que varios otros flavonoides estructuralmente relacionados a quercetina pueden sufrir oxidación química y/o electroquímica que conduce a la formación de metabolitos cuyas estructuras son comparables a las de Q-BZF. Ejemplos de estos últimos flavonoides son kaempferol (Jørgensen *et al.*, 1998; Jungbluth y Ternes, 2000), morina y miricetina (Jungbluth y Ternes, 2000), fisetina (Jungbluth y Ternes, 2000; Ramesová *et al.*, 2014; Sokolová *et al.*, 2016), ramnazina (Ramesová *et al.*, 2014) y ramnetina (Ramesová *et al.*, 2017). La formación de los derivados de 2-

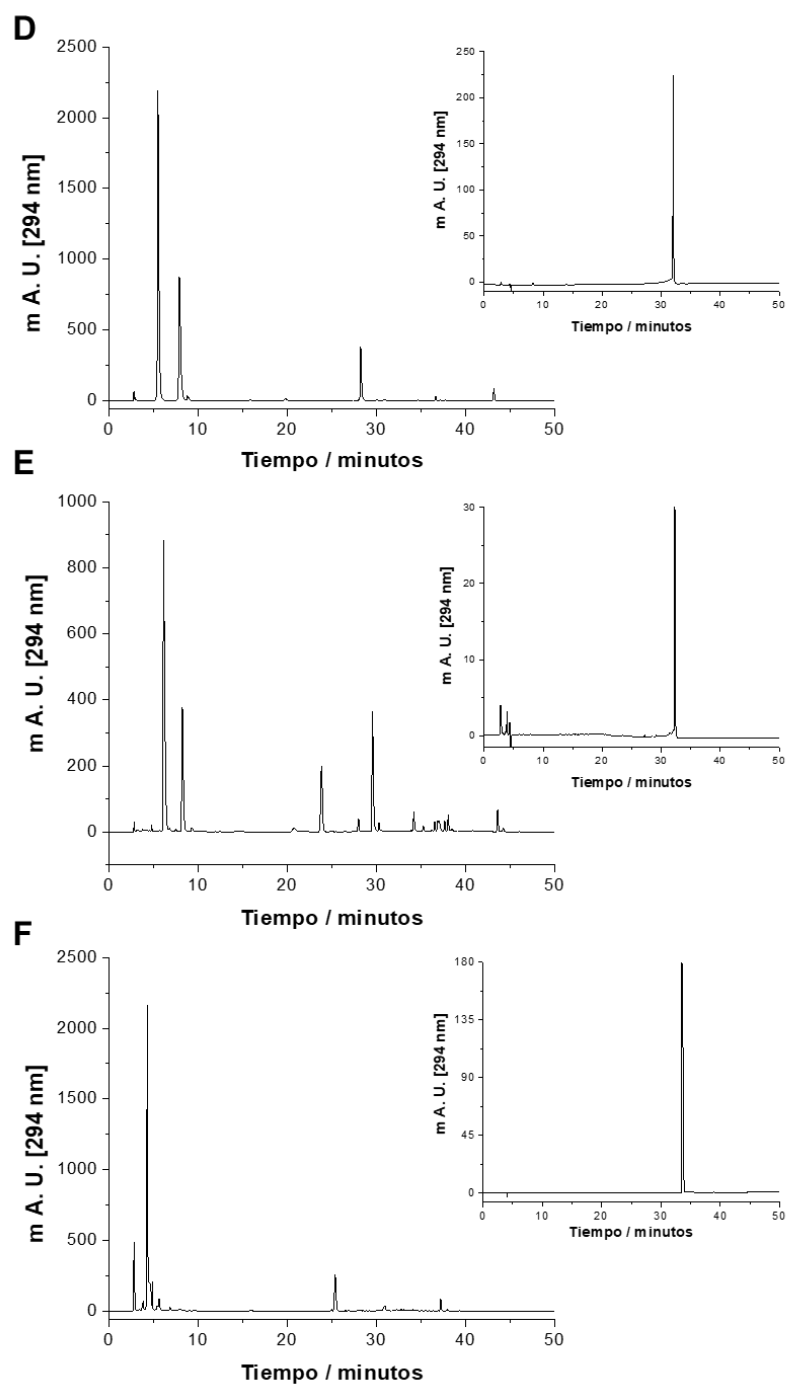
(benzoil)-2-hidroxi-3(2H)-benzofuranona (BZF) correspondientes a cada uno de los seis flavonoides mencionados anteriormente requiere que se forme un intermedio quinona metido, sigue un camino comparable al del Q-BZF (Fig. 13), y conduce a la formación de una serie de BZF donde solo se cambia el anillo C del flavonoide original (Jørgensen *et al.*, 1998; Ramesová *et al.*, 2017). Según estos estudios anteriormente descritos y los resultados de la identificación por espectrometría de masas de las BZF en este trabajo, desde el punto de vista de los requisitos estructurales, la formación de dicho BZF se limita al tipo de flavonoide flavonol y parece exigir que, además de un sustituyente hidroxilo en C3, un doble enlace en C2-C3 y un carbonilo en C4 (es decir, las características básicas de cualquier flavonol), el flavonol posee al menos un grupo hidroxilo en su anillo A y B (Jørgensen *et al.*, 1998, Ramesová *et al.*, 2015; Hermanková *et al.*, 2019). Cabe destacar que en ninguno de estos estudios donde se describe la formación de la BZF derivada tras la oxidación de flavonoides análogos a quercetina se discuten ni ensayan las implicaciones biológicas en alguna bioactividad por parte de las BZF u otros metabolitos generados tras el proceso de oxidación de estos flavonoides.

#### **5.4 Resultados relacionados con el objetivo específico 4**

##### **5.4.1. Obtención de mezclas FLox libre de BZF mediante sustracción química y comparación de su capacidad antioxidante celular con las mezclas FLox completas.**

Para dilucidar la contribución de las BZF identificadas a la capacidad antioxidante de las mezclas generadas tras la oxidación de flavonoides (FLox) que las contienen (MYRox, Qox, FISox, KAEMox, ISORox y MORox), se realizó una remoción experimental de cada BZF de dichas mezclas mediante HPLC acoplado a un colector de fracciones. Se recogieron todos los picos que eluyeron en la cromatografía, excepto el pico identificado como BZF (determinado en el punto 5.3.1), generando dos fracciones, FLox libre de BZF y BZF aislado. A continuación, ambas fracciones se secaron y se reconstituyeron en PBS para ensayos celulares posteriores. Además, se recolectó la corrida cromatográfica completa que posteriormente se llevó a sequedad y se reconstituyó en PBS para evaluar la capacidad antioxidante del FLox completo en las mismas condiciones. Antes de medir su capacidad antioxidante, cada FLox, FLox libre de BZF y BZF aislado fueron recromatografiados hasta comprobar si conservaban en gran medida sus características iniciales, tal era el caso como se muestra en los cromatogramas de la Figura 12.



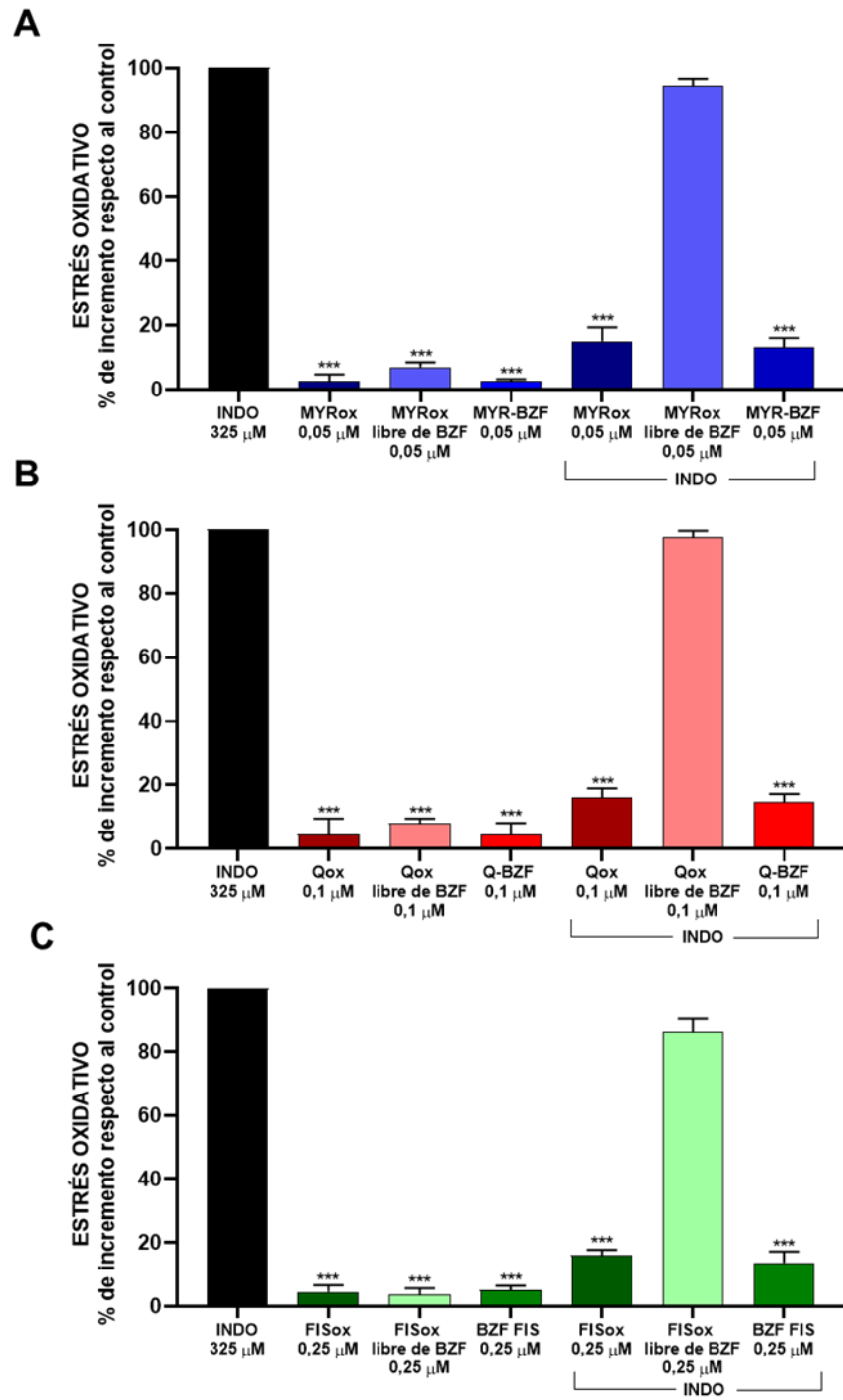


**Figura 12. Cromatogramas HPLC-DAD de las mezclas de oxidación de FLOx cuando se elimina la BZF de su composición (FLOx libre de BZF) y, en el lado derecho se presenta el cromatograma de la respectiva BZF aislada. (A) MYRox libre de BZF y MYR-BZF; (B) Qox libre de BZF y Q-BZF; (C) FISox libre de BZF y FIS-BZF; (D) KAEMox libre de BZF y KAEM-BZF; (E) ISORox libre de BZF y ISO-BZF; (F) MORox libre de BZF y MOR-BZF.**

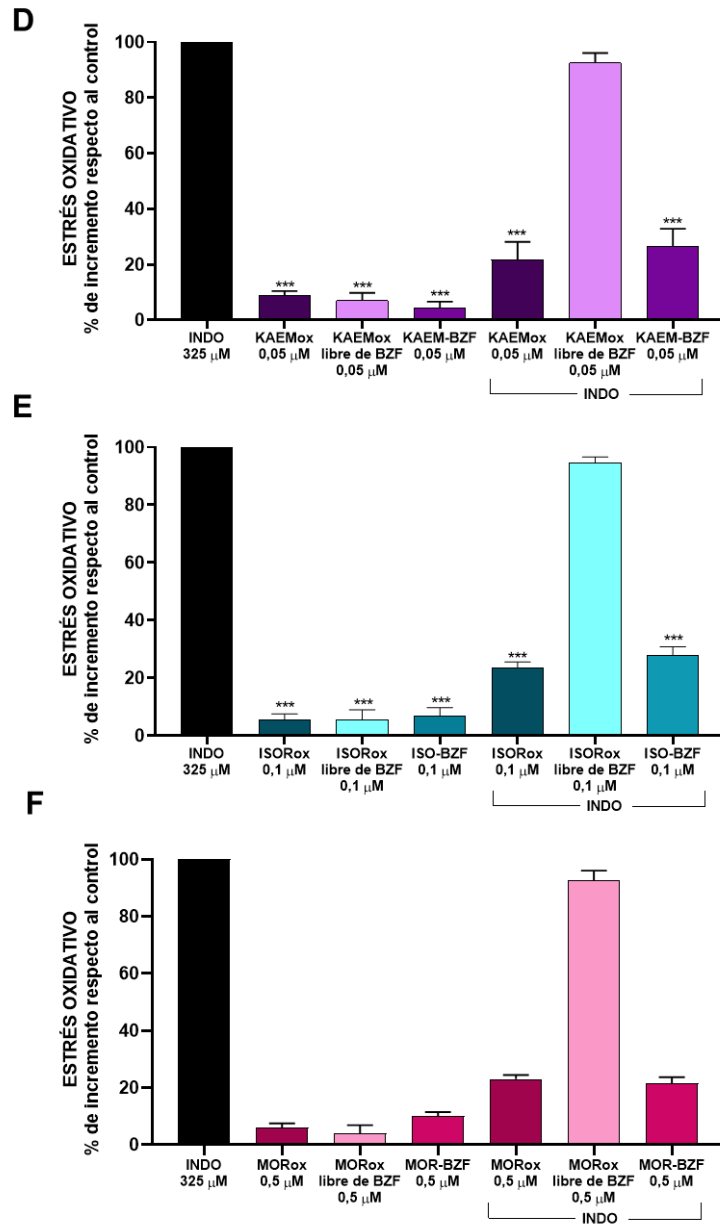
Desde las seis mezclas FLox fue posible obtener una mezcla libre de su correspondiente benzofuranona los cromatogramas se muestran en la figura 10. Estas nuevas mezclas formadas, junto con el FLox total y la fracción de BZF aislada, fueron ensayadas en células Caco-2 expuestas a ROS (Figura 13) en las concentraciones relativas a las que el FLox ya ha demostrado ser eficaz para proteger frente al 80% del daño causado por la indometacina, resultados descritos en el apartado 5.2.1.

En la Fig.13A se muestra que MYRox y MYR-BZF protegieron del 80% del daño oxidativo celular a una concentración de 0,05  $\mu\text{M}$  (expresado en equivalentes de miricetina). Sin embargo, cuando se probó MYRox libre BZF a la misma concentración descrita, esta mezcla no exhibió capacidad antioxidante alguna.

Qox y Q-BZF (Figura 13B) protegen a las células expuestas a ROS a una concentración equivalente de 0,1  $\mu\text{M}$ , mientras que al ensayar Qox libre de su BZF a 0,1  $\mu\text{M}$  se pierde por completo la protección frente al daño oxidativo ocasionada por indometacina. Como para esta BZF se puede obtener la concentración real según la curva de calibración, se presenta a continuación los cálculos realizados para obtener dicha concentración:







**Figura 13. Comparación de la capacidad antioxidante de las mezclas de oxidación FLox cuando se elimina químicamente de su composición el peak asociado a la benzofuranona (BZF).** La figura muestra la capacidad antioxidante que presenta cada mezcla de oxidación, cada mezcla después de restar el BZF (MYRox, Qox, FisoX, KAEMox, ISORox y MORox BZF-free) y el peak que contiene cada BZF aislada. Estas condiciones se probaron a la misma concentración equivalente a la que la mezcla de oxidación protege a las células Caco-2 tratadas con indometacina del 80% del aumento del estrés oxidativo. Los datos se presentan como media  $\pm$  D.S. \*,  $p < 0,05$ . \*\*,  $p < 0,01$ . \*\*\*,  $p < 0,001$ , respecto a INDO. ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

*En Qox 1mM hay 25000 U. A. de BZF de quercetina ( $\lambda$  294nm)*

*que equivalen a 467,9  $\mu$ M según curva de calibración.*

*Entonces cuando se evalúa Qox 0,1  $\mu$ M corresponde*

$$a 4,7 * 10^{-2} \mu M \text{ de } Q - BZF$$

Entonces, al contrastar con la Figura 14A, se puede observar que a las concentraciones reales de 0,01  $\mu$ M y 0,05  $\mu$ M de Q-BZF aislada (rango que se encuentra la concentración de Q-BZF presente en Qox 0,1  $\mu$ M), este compuesto exhibe una protección del 80% contra el daño oxidativo inducido por INDO, validando de esta manera los resultados obtenidos en este punto.

A una concentración de 0,25  $\mu$ M (equivalentes de fisetina) de FISox y FIS-BZF (Figura 13C), también mostraron el nivel de protección descrito anteriormente. Asimismo, cuando se probó FISox libre de BZF, este último perdió en gran medida los efectos observados en FISox.

En el caso de KAEMox y KAEM-BZF (Figura 13D) protegen a las células en el nivel descrito con anterioridad a una concentración 0,05  $\mu$ M (expresada en equivalentes de kaempferol oxidado), mientras que cuando a KAEMox se le remueve de su composición a la BZF (originando KAEMox libre de BZF), el efecto protector se anula por completo. De igual manera que para Q-BZF, con la BZF derivada de kaempferol se puede obtener una concentración real de este metabolito en KAEMox mediante su respectiva curva de calibración. La deducción se detalla a continuación:

*En KAEMox 1mM hay 1300 U. A. de BZF de kaempferol ( $\lambda$  294nm)*

*que equivalen a 23,97  $\mu$ M según curva de calibración.*

*Entonces cuando se evalúa KAEMox 0,05  $\mu$ M corresponde*

*a  $1,2 * 10^{-3} \mu$ M de KAEM – BZF*

Al contrastar los efectos protectores del daño oxidativo de esta concentración de KAEM-BZF en KAEMox versus dicha BZF aislada (Figura 13B) se observa que en el caso de la BZF aislada una concentración de 0,001  $\mu$ M exhibe una disminución del 80% de daño asociado a la exposición del AINE indometacina, validando de esta manera este resultado.

Con ISORox y ISO-BZF (Figura 13E) a una concentración equivalente de 0,1  $\mu$ M se observa protección del 80% del daño celular, y de igual manera con lo descrito para los otros FLox, cuando se remueve el peak de la BZF de ISORox, esta mezcla generada no es capaz de ejercer protección en ningún nivel a las células tratadas.

Por último, para el caso de MORox y MOR-BZF, cuando se prueban en células expuestas a ROS a una concentración de 0.5  $\mu$ M (equivalentes de morina), se previene el 80% del daño causado por indometacina (Figura 13F). Como respaldo a los hallazgos informados anteriormente, no se observa protección cuando se prueba MORox libre de su respectiva BZF.

Estos datos demuestran que la capacidad antioxidante de aquellas

mezclas FLox, que demostraron ser capaces de inhibir el estrés oxidativo celular, ya no se observa cuando las mezclas han sido desprovistas experimentalmente de su correspondiente BZF. Todos los FLox, sus fracciones libres de BZF y BZF aisladas cuando se probaron en células en ausencia del agente generador de daño oxidativo no mostraron ningún aumento significativo en el estrés oxidativo intracelular por sí mismos. Estos resultados muestran que las BZF serían las únicas responsables de la retención y, lo que es más importante, de la amplificación del efecto antioxidante protector en las mezclas de metabolitos generados tras la oxidación en medio alcalino de MYR, Q, FIS, KAEM, ISO y MOR evaluadas en su respectiva  $CE_{80}$ .

Al suponer las gráficas de los efectos antioxidantes tanto de los FLox como de su correspondiente BZF (ANEXO III) se puede observar que para el caso de los FLox la ventana de efectos antioxidantes cercanos al 80% de protección es más corta que en el caso de las BZF. Las BZF aisladas exhiben un mayor rango de protección frente al daño oxidativo inducido por INDO. Eventualmente la menor retención de estos efectos antioxidantes por los FLox se podría deber a que en su composición se encuentran otros metabolitos generados tras el proceso de oxidación, que podrían ejercer un efecto pro-oxidante contrarrestando más “rápidamente” el efecto protector. Esto último en concordancia con el concepto de estrés oxidativo intracelular que hemos definido como un fino balance estrés especie oxidantes y antioxidantes. Tanto

FLox como las BZF aisladas muestran tener una respuesta de hormesis frente a la protección contra el daño inducido por indometacina, este concepto será ahondado más adelante.

Al buscar información sobre las consecuencias asociadas al proceso de oxidación de flavonoides, se encuentra que un número muy limitado de estudios ha abordado las implicaciones que tiene la oxidación de la quercetina en sus propiedades antioxidantes.

En otros estudios, incluso algunos de los intermediarios electrofílicos formados durante la oxidación de la quercetina han sido implicados en la mutagenicidad y citotoxicidad reportada para este flavonoide *in vitro* (Metodiewa *et al.*, 1999; Galati *et al.*, 2002; Kessler *et al.*, 2003) e *in vivo* (Choi *et al.*, 2003). Pero en contraste, a esta información Harwood *et al.* (2007) ha revisado que la significancia biológica actual estos efectos tóxicos es altamente debatible y falta evidencia *in vivo* robusta.

Desde un punto de vista estructural, la conversión oxidativa de la quercetina en su Q-BZF no afecta los anillos A y B del flavonoide, pero cambia drásticamente el anillo C, ya que su anillo de pirano de seis átomos se convierte en un anillo de furano de cinco átomos. Teniendo en cuenta los tres criterios de Bors para una actividad óptima (Bors *et al.*, 1990), se esperaría que la capacidad de captación de radicales libres del Q-BZF fuera significativamente menor que la de la quercetina por el solo hecho de que su estructura carece del doble enlace C2-C3, necesarios para la estabilización

radical. Basado en esto último, parece razonable suponer que una consecuencia última de la oxidación de la quercetina sería la pérdida relativa de su potencia original de captación de radicales libres. Sin embargo, basándose en los resultados descritos hasta ahora en esta tesis y en los estudios anteriormente mencionados de Átala *et al.* (2017), en el que se demostró que la oxidación de varios flavonoides da como resultado mezclas de metabolitos que, en lugar de perder, retienen en gran medida las propiedades de eliminación de ROS de los flavonoides no oxidados, tal suposición necesitaba ser revisada.

Como los peaks aislados que contienen a las BZF de MYR, Q, FIS, KAEM, ISO y MOR demuestran ser los únicos responsables de la amplificación en la capacidad antioxidante exhibida por las mezclas FLox originadas tras la oxidación de los flavonoides antes descritos, se precisa conocer el rango de acción de estas BZF en el sistema celular antes referido.

## **5.5. Resultados relacionados con el objetivo específico 5 y 6**

### **5.5.1. Aislamiento de las BZF para ensayos celulares y evaluación de su capacidad antioxidante**

Habiendo establecido que las mayores propiedades antioxidantes de cada FLox surgen de y dependen totalmente de la presencia de BZF en su composición, se investigó la posible concentración-dependencia de los efectos antioxidantes de las BZF aisladas desde sus respectivos FLox determinadas en el objetivo 3.

Para el caso de las BZF de quercetina y kaempferol, como se dispone del coeficiente de extinción molar de estos compuestos en etanol, fue posible realizar una curva de calibración que permitió establecer las concentraciones reales de estas dos moléculas en los ensayos celulares. Se aisló una fracción de cada BZF por HPLC-DAD, se llevó a sequedad, se reconstituyó en etanol y se midió su absorbancia en espectrofotómetro. Luego con el coeficiente de extinción molar se determina la concentración de esta fracción aislada. Con estas muestras, se forman diluciones entre concentración 1 -150  $\mu\text{M}$  para Q-BZF y entre 1-50  $\mu\text{M}$  para KAEM-BZF para luego inyectar estas diluciones al HPLC y obtener sus respectivas áreas para obtener las curvas de calibración respectivas. Para las demás BZF (MYR-BZF, FIS-BZF, ISO-BZF y MOR-BZF) las concentraciones ensayadas se calcularon en base al área bajo la curva de

estos peak en el cromatograma del respectivo FLox, por ello se denominan concentraciones equivalentes (mismo caso con FLox).

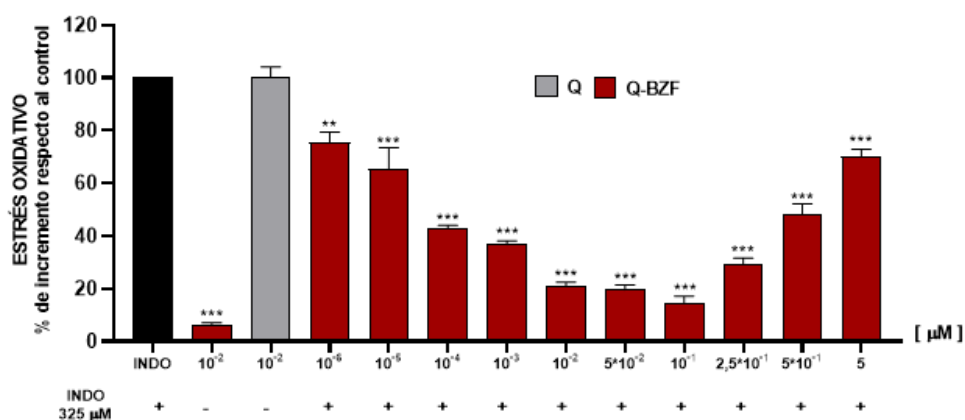
Luego de aislar cada una de las BZF, fueron llevadas a sequedad para ser reconstituidas en tampón fosfato de sodio apto para el ensayo celular. Pero antes de exponer a las células a la interacción con estas moléculas, se determinó la estabilidad de las BZF aisladas en buffer por 2 horas mediante análisis por HPLC-DAD, durante este tiempo estas moléculas están en contacto con las células. Los resultados se muestran en la Tabla 3. La BZF que se preserva más durante las dos horas de análisis fue ISO-BZF con un 85,30 % de concentración remanente y las BZF que más se degradó durante estas 2 horas fue MYR-BZF encontrándose un 67,7% de su concentración. Con estos datos, se decide realizar los experimentos celulares inmediatamente luego de aislar estas moléculas y reconstituirlas en tampón fosfato de sodio para minimizar lo más posible la degradación de estas moléculas en solución.



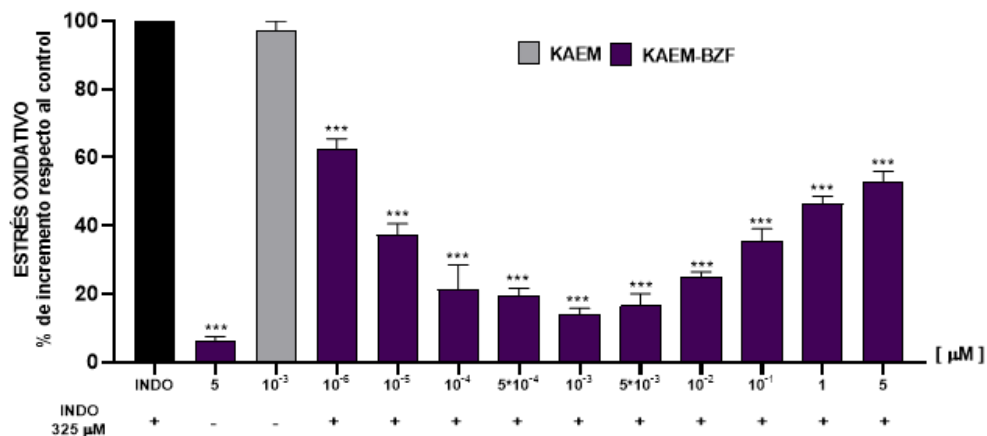
**Tabla 3.** Concentraciones remanentes de las BZF aisladas reconstituídas en PBS obtenidas mediante HPLC-DAD tras 1 y 2 horas de análisis.

<b>Benzoil-benzofuranonas (BZF)</b>	<b>% de concentración remanente tras 1 h de reconstitución en PBS</b>	<b>% de concentración remanente tras 2 h de reconstitución en PBS</b>
<b>MYR-BZF</b>	85,3 %	67,7 %
<b>Q-BZF</b>	89,2 %	81,9 %
<b>FIS-BZF</b>	87,4 %	77,6 %
<b>KAEM-BZF</b>	93,6 %	83,5 %
<b>ISO-BZF</b>	93,7 %	85,4 %
<b>MOR-BZF</b>	83,7 %	75,8 %

**A**



**B**



**Figura 14. Efectos antioxidantes de concentraciones reales crecientes de un preparado aislado de BZF obtenido a partir de la oxidación de quercetina (A) y kaempferol (B).** Los efectos antioxidantes se expresan como el porcentaje de protección proporcionado por cada BZF o por el flavonoide frente al aumento del estrés oxidativo inducido por la indometacina 325 µM. Los datos se presentan como media ± D.S. \*\*, p < 0,01. \*\*\*, p < 0,001, respecto a INDO. ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

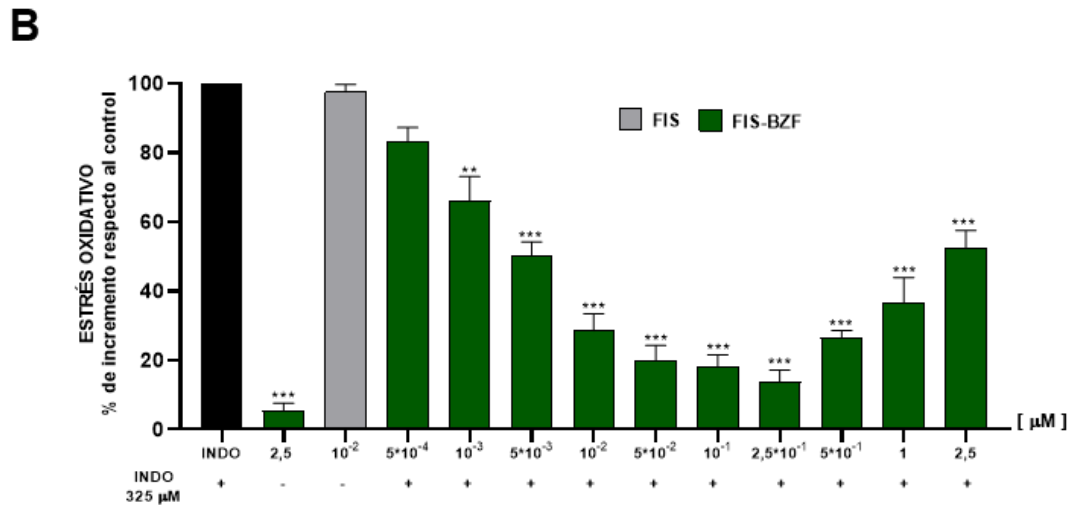
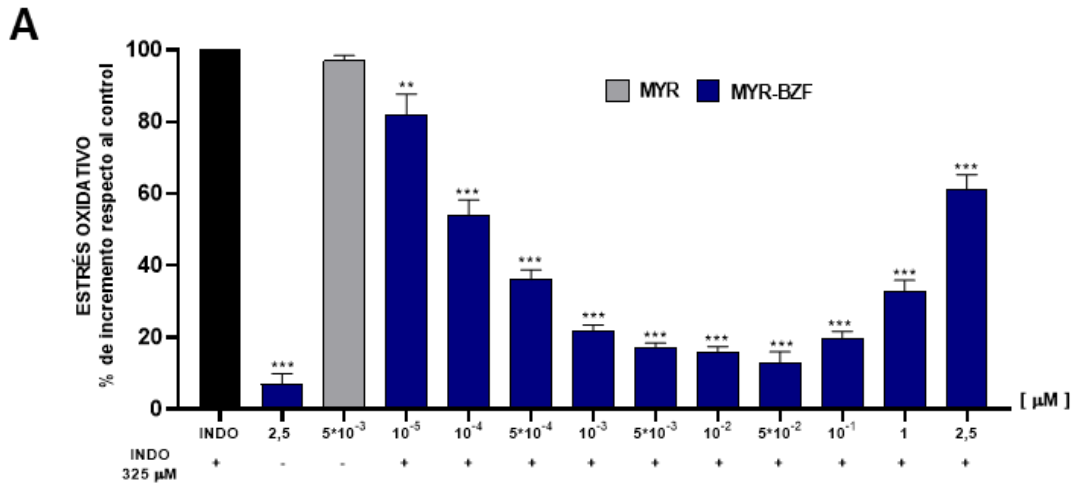
La figura 14 y 15 muestra la acción frente al daño oxidativo de las seis BZF (MYR-BZF, Q-BZF, FIS-BZF, KAEM-BZF, ISO-BZF y MOR-BZF) en un amplio rango de concentraciones o concentraciones equivalentes según corresponda. Para estandarizar y realizar comparaciones se menciona la concentración más baja a la que las BZF aislada ejercen una protección del 80% del daño oxidativo a las células expuestas a ROS.

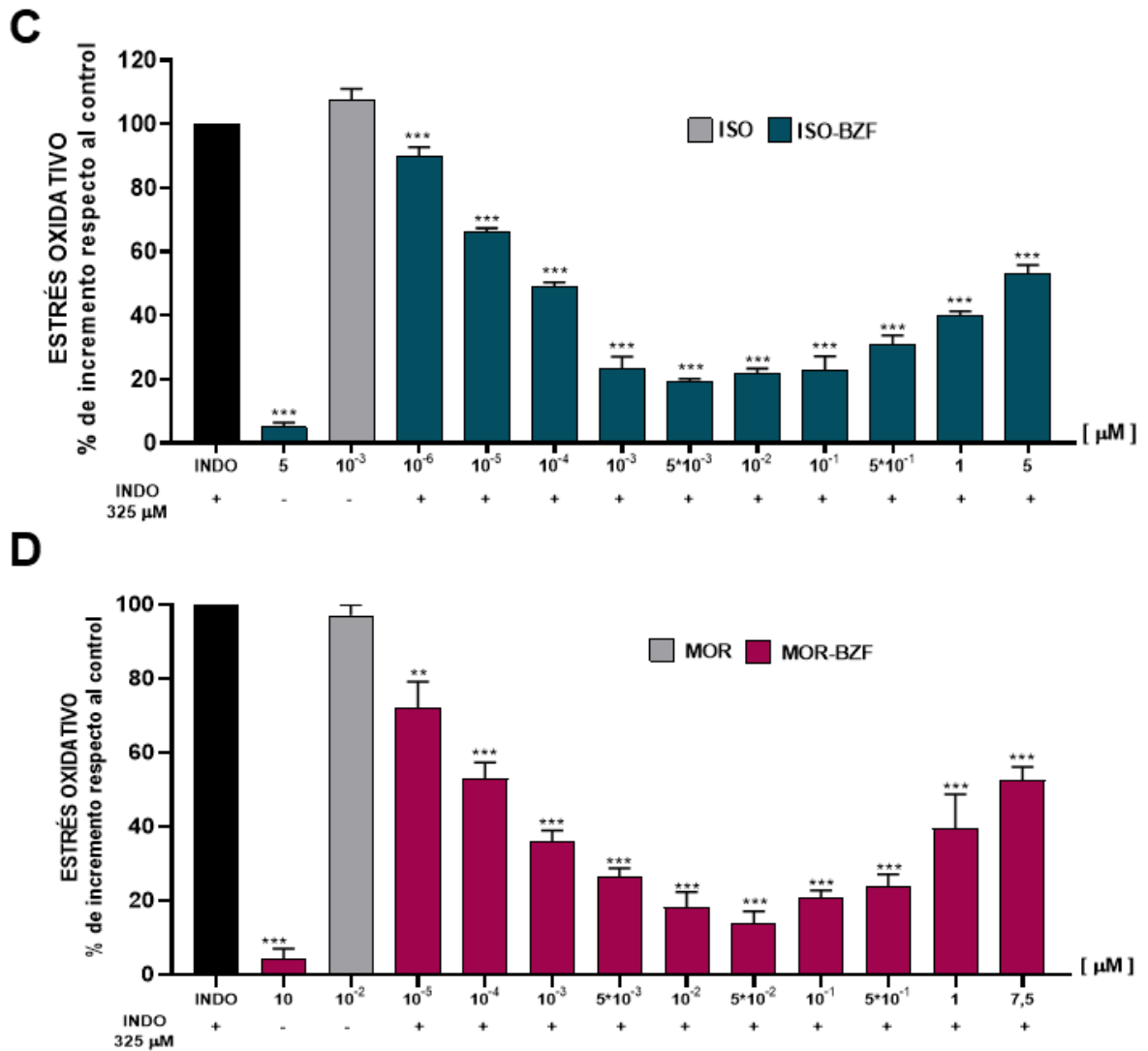
Con la Q-BZF (Figura 14A) se ejerce una protección del 80% de aumento del tono oxidativo intracelular ocasionado por indometacina a una concentración de 0,05  $\mu\text{M}$ . Y en el caso de KAEM-BZF este nivel de protección se exhibe a una concentración de 0,001  $\mu\text{M}$  (Figura 14B).

Pasando a las BZF que su concentración se estima en base a la cantidad de flavonoide que se expuso a oxidación, se observa que MYR-BZF (Figura 15A) muestra una respuesta protectora frente al 80% del daño inducido por el AINE a una concentración equivalente de 0,005  $\mu\text{M}$  (equivalente de miricetina). Se observa en Fig. 15B que a una concentración equivalente de 0,05  $\mu\text{M}$  de FIS-BZF (equivalente de fisetina), se ejerce el mismo nivel de protección. El efecto protector de la BZF-ISO (Fig. 15C) se exhibe a 0,005  $\mu\text{M}$  y finalmente MOR-BZF (Fig. 15D) protege del 80% daño oxidativo a una concentración equivalente de 0,01  $\mu\text{M}$  (equivalente de morina).

Cuando estas concentraciones se prueban en ausencia del agente que causa el daño oxidativo, ninguno de las BZF exhibe por sí mismo un aumento en el estrés oxidativo intracelular. Por otro lado, los flavonoles originales

también se ensayaron y no mostraron ningún nivel de protección en presencia de indometacina en las concentraciones en las que los BZF mostraron una protección del 80 % contra el estrés oxidativo.





**Figura 15. Efectos antioxidantes de concentraciones equivalentes crecientes de preparados aislados de BZF derivados de los flavonoides: miricetina (A), fisetina (B), isoramnetina (C) y morina (D).** Los efectos antioxidantes se expresan como el porcentaje de protección proporcionado por cada BZF o por el flavonoide frente al aumento del estrés oxidativo inducido por la indometacina (INDO) 325 μM. Los datos se presentan como media ± D.S. \*, p < 0,05. \*\*, p < 0,01. \*\*\*, p < 0,001, respecto a INDO. ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

En la figura 14 y 15 se aprecia como se repite el compartimento bifásico de los FLox, ahora con la respuesta celular antioxidante mediada por las BZF. Se observa que a concentraciones o concentraciones equivalentes más altas se comienza a perder progresivamente el efecto protector y lo mismo ocurre si la concentración disminuye ampliamente. Solo en el rango de concentraciones o concentraciones equivalente intermedias evaluadas, estas moléculas son efectivas para contrarrestar en gran medida los efectos deletéreos del aumento del estrés oxidativo inducido por indometacina. Tal comportamiento bifásico sugiere que las BZF desencadenan una respuesta "parahormética" (Forman *et al.*, 2014), donde estas moléculas pueden inducir efectos biológicos opuestos a diferentes concentraciones (Calabrese *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta la baja biodisponibilidad de los flavonoides, que probablemente sea aplicable a los BZF debido a su similitud estructural, es poco probable que los BZF entren en las células en concentraciones ( $10^{-3}$  a  $10^{-2}$   $\mu\text{M}$ ) necesarias para ejercer protección antioxidante y citoprotectora a través del atrapamiento directo de ROS. Esto se debe a que el glutatión reducido intracelularmente (GSH) existe en una concentración mucho mayor en las células. De hecho, se puede estimar que las células contienen alrededor de  $10^7$  a  $10^{10}$  moléculas de GSH (Galleano *et al.*, 2010), por lo que la eliminación directa de radicales libres por BZF tendría una relevancia limitada.

Tendría más sentido si se piensa que a estas extremadamente bajas concentraciones, las BZF podrían estar despertando el sistema de defensa

antioxidante indirecto de la célula, por ejemplo, activando el factor transcripcional Nrf2 (factor nuclear -derivado de eritroide 2- similar a 2) que contiene en su región promotora al elemento de respuesta antioxidante (ARE) o más comúnmente conocido como elemento de respuesta a electrófilos (EpRE) y, por lo tanto, regula la expresión de una gran batería de genes involucrados en la defensa celular antioxidante y anti-inflamatoria o podrían estar inhibiendo la activación de alguna vía celular que conlleve a un daño oxidativo.

Debido a que se puede generar BZF durante la interacción entre quercetina y ROS (Zhou y Sadik, 2008), se podría especular que, durante el estrés oxidativo inducido por la indometacina en las células, algunas moléculas de estos flavonoides podrían oxidarse formando benzofuranona. Dado esto, también podemos elucubrar otro mecanismo, que podría estar actuando en conjunto con los otros propuestos, por el cual las BZF estarían protegiendo del aumento en el tono oxidativo intracelular inducido por indometacina. Se ha establecido que este AINE promueve el aumento de estrés oxidativo al disminuir los niveles de GSH intracelular (Carrasco-Pozo *et al.*, 2010, Fuentes *et al.*, 2021) e induce la disfunción mitocondrial (Maity *et al.*, 2009). INDO ha demostrado que desacopla la fosforilación oxidativa, disipa el potencial de membrana mitocondrial y disminuye los niveles de ATP mitocondrial, todo esto finalmente conlleva a un aumento de la producción de ROS intracelular, entre otros efectos (Moreno-Sánchez *et al.*, 1999).

A mayores concentraciones que las ensayadas para las BZF aisladas en este estudio (sobre 10  $\mu\text{M}$ ), podríamos suponer que estaríamos en presencia de una respuesta nula frente al estrés oxidativo o incluso un efecto pro-oxidante. Este mismo efecto bifásico ya ha sido descrito para muchos fitoquímicos (Jodynys-Liebert *et al.*, 2020), por ejemplo para la actividad antioxidante de quercetina en células HepG2 (hepatoma humano) expuestas a peróxido de hidrógeno desde un punto de vista temporal, donde dosis de quercetina de 10 y 100  $\mu\text{M}$  producen efectos antioxidantes en 30 minutos de exposición, pero la exposición a quercetina a 100  $\mu\text{M}$  durante más de 12 horas produce efectos pro-oxidantes/pro-apoptóticos en las células (Kim y Jang, 2009). Por otra parte, en microsomas de hígado de rata, quercetina y miricetina inhibieron poderosamente la peroxidación de lípidos inducida por hierro en concentraciones micromolares bajas ( $\text{IC}_{50} \leq 1,5 \mu\text{M}$ ). Sin embargo, todos estos compuestos a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  incrementaron enormemente la formación de radicales hidroxilos hasta ocho veces (Laughton *et al.*, 1989). De manera similar, la protección de leucocitos humanos contra el daño oxidativo en el ADN inducido por superóxido por parte de quercetina fue ambigua. Las concentraciones de incubación de quercetina (1–50  $\mu\text{M}$ ) redujeron los niveles de daño oxidativo del ADN, mientras que a 100  $\mu\text{M}$  aumentó la cantidad de daño (Wilms *et al.*, 2008). Se recalca que estas acciones pro-oxidantes para quercetina y otros flavonoides se ha sido evidenciado en un rango espacial, temporal y dosis-dependiente muy preciso.



El efecto pro-oxidante si bien no se evidencio en alguna de las concentraciones ensayadas para las BZF, si se observó en las concentraciones más altas ensayadas para algunos FLox, como MYRox, Qox y KAEMox (Figura 6). Dentro de los metabolitos generados durante la oxidación de flavonoides con un grupo catecol en el anillo B, se encuentran los derivados semiquinona y quinona de dichos compuestos, estos han mostrado un potencial pro-oxidante (Metodiewa *et al.*, 1999; Chedea *et al.*, 2012)

Cabe destacar que estas propiedades pro-oxidantes podrían no ser del todo deletéreas, ya que se ha visto que la habilidad de algunos flavonoides para activar la respuesta mediada por EpRE se correlaciona con sus propiedades redox. Los flavonoides con un mayor potencial intrínseco para generar estrés oxidativo y ciclo redox (quercetina y miricetina) son los inductores más potentes de la expresión génica mediada por EpRE-Nrf2 (Lee-Hiltz *et al.*, 2006). Tipos de enfermedades crónicas que actualmente están muy extendidas como el cáncer y las enfermedades neurológicas que se caracterizan por mecanismos opuestos. Por un lado, cáncer se compone por mayor resistencia a la muerte celular y por otro lado, Alzheimer está determinado por una muerte celular prematura. Sin embargo, el estrés oxidativo parece ser un denominador común en ambos estados patológicos. Desde el punto de vista farmacológico, moléculas bifuncionales como las BZF que muestran propiedades antioxidantes bajo ciertas condiciones, pero propiedades prooxidantes bajo otras, serían de vital importancia.

Vinculando los resultados de protección celular, el comportamiento bifásico exhibido por las BZF llegando eventualmente a tener la capacidad de generar estrés oxidativo a concentraciones mayores podría ser resultado de una acción a nivel mitocondrial, probablemente interfiriendo en el descoplamiento en el complejo I de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria y dejando que se “fuge el anión superóxido” producido. A concentraciones menores quizás este mismo efecto evitaría que INDO generé el descoplamiento porque es desplazada desde el sitio de unión al complejo I por la BZF. Es interesante teorizar que quizás estas BZF desplacen a AINES en muy bajas concentraciones porque poseen mayor afinidad por los complejos mitocondriales, pero a no logran desacoplarlos, evitando así la toxicidad del AINE, pero que a altas concentraciones las mismas BZF potencian el desacople de la cadena transportadora de electrones y produciendo acumulación de anión superóxido, con el consecuente aumento en la formación de peróxido de hidrógeno, que es deletéreo para la célula. Lo que se evidencia principalmente al aumentar la cantidad de ROS producidos por el complejo I mitocondrial es una relación NADH/NAD<sup>+</sup> alta. Por el contrario, las condiciones que reducen la relación NADH/NAD<sup>+</sup> tienden a suprimir la producción de ROS (Starkov *et al.*, 2003). Por ejemplo, se ha observado que quercetina a 5 µM ha sido capaz de aumentar los niveles de NAD<sup>+</sup> disminuyendo dicha relación (Boesten *et al.*, 2015). Se podría presumir que las BZFs a bajas concentraciones podrían aumentar los niveles de NAD<sup>+</sup> y al contrario, a concentraciones altas podrían aumentar los niveles de NADP

revirtiendo esta relación en función de un aumento de ROS (Díaz-Vegas *et al.*, 2020). Sería interesante averiguar qué papel juegan las BZF en el estatus mitocondrial ya que se sabe que muchas enfermedades crónicas no transmisibles cursan con alteraciones funcionales en este organelo

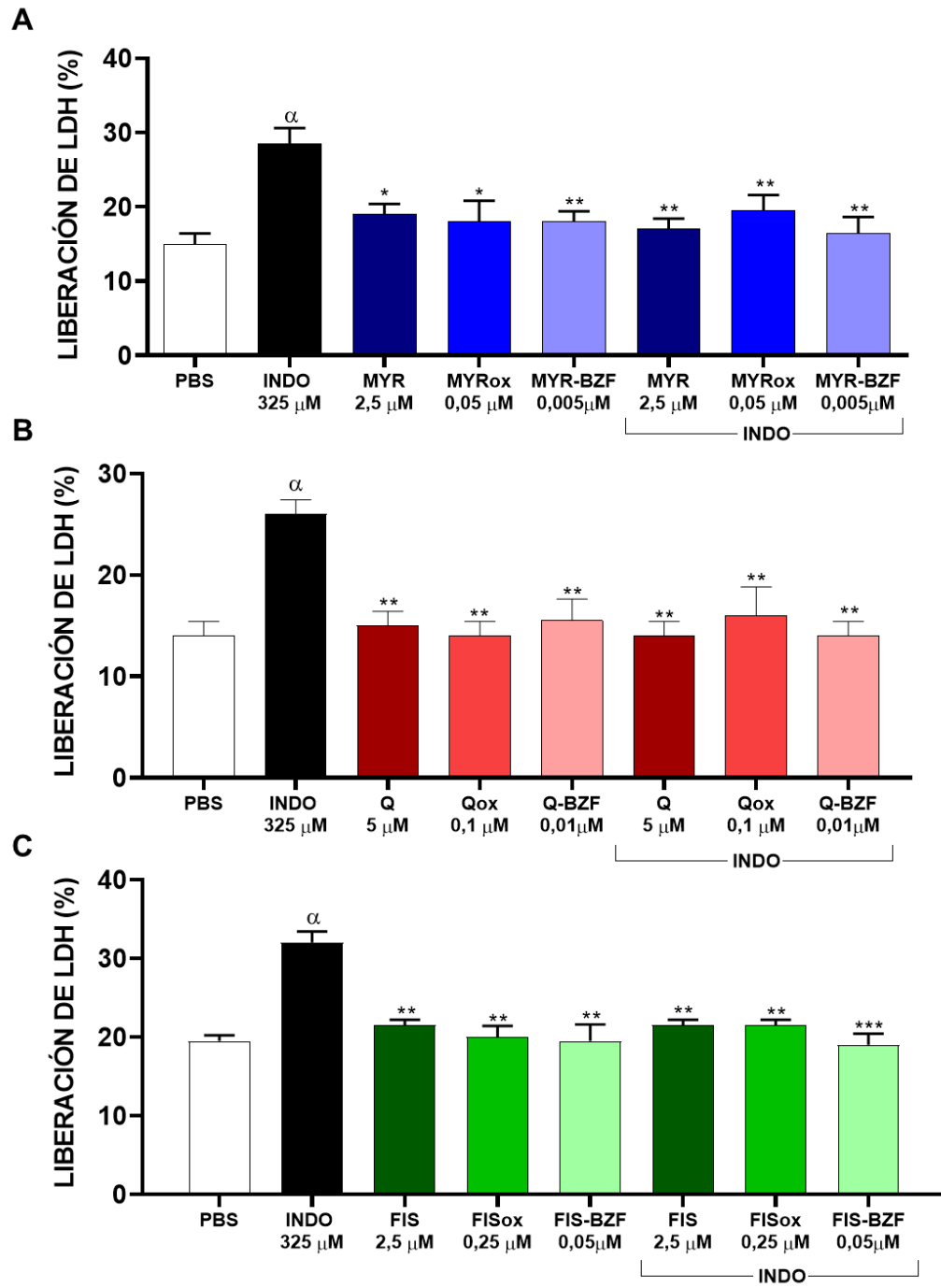
Por otra parte, la presencia de una BZF ha sido reportada en una especie vegetal de carácter alimentario. Q-BZF ha sido identificada en extractos de cáscaras secas de cebollas (Ly *et al.*, 2005). Aprovechando la presencia natural de Q-BZF en la piel externa de cebollas, recientemente Fuentes *et al.* (2020) desarrollaron un extracto acuoso de dicho material vegetal (OAE) estandarizado en términos de Q-BZF y se demostró que OAE protege a las células Caco-2 contra el estrés oxidativo, además del daño mitocondrial y lítico inducido por la indometacina. Se informó que dicha protección se perdía totalmente después de la sustracción química selectiva de Q-BZF desde OAE, lo que reveló que la capacidad del extracto para proteger las células reside únicamente en la presencia de Q-BZF en su composición. También se evidenció el comportamiento bifásico dependiente de la concentración de la protección antioxidante sugiere que Q-BZF aislada desde OAE desencadena también una respuesta "parahormética" de igual manera como lo exhibido por las BZF aisladas provenientes desde la oxidación de miricetina, fisetina, kaempferol, isoramnetina y morina, estudiadas en este trabajo. Al encontrar que la Q-BZF se produce en una fuente de origen vegetal, que es más bien un descarte alimentario, abre las perspectivas de la búsqueda

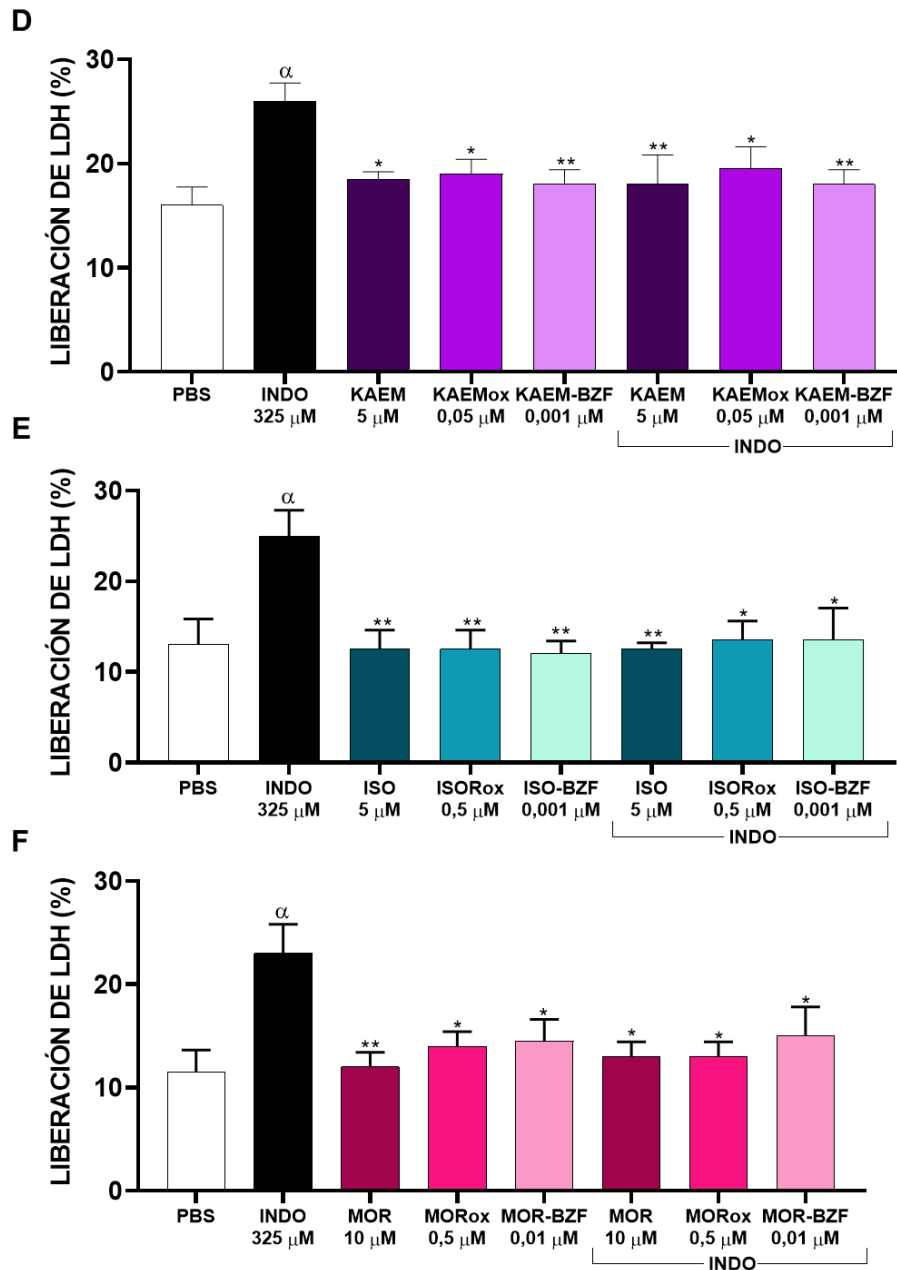
de los otros metabolitos tipo BZF identificados y testeados en este trabajo en especies vegetales alimentarias o sus descartes, así iniciando un nuevo nicho de aplicaciones de este grupo de novedosas moléculas.

### **5.5.2 Comparación de la capacidad citoprotectora de BZF, FLox y flavonoides**

Además de evaluar la capacidad antioxidante de BZFs, se evaluó el potencial de estas moléculas aisladas y sus respectivos FLox y flavonoides para proteger a las células Caco-2 contra los efectos líticos celulares (es decir, pérdida de LDH) y la alteración mitocondrial (es decir, reducción-inhibición de MTT) por parte de indometacina (Figura 16 y 17).

Como se muestra en la Fig. 16, la pérdida basal de LDH (correspondiente a células tratadas con PBS) aumentó casi al doble con la indometacina. Este efecto se evitó por completo cuando se añadió cada BZF, FLox y FL a la concentración  $CE_{80}$  respectiva. Como se puede observar, la protección ejercida es similar, estimándose este parámetro entre un 86 y 99%. Ninguna condición evaluada en ausencia del generador de daño lítico muestra aumentar la liberación de LDH significativamente respecto a las células tratadas por PBS.





**Figura 16. Comparación de la capacidad de flavonoides, FLOx y BZF aisladas en proteger a células Caco-2 contra el incremento en la liberación de LDH inducido por indometacina (INDO).** En los gráficos se muestra los tratamientos relacionados con: miricetina (A), quercetina (B), fisetina (C), kaempferol (D), isoramnetina (E) y morina (F). Los datos se presentan como media  $\pm$  D.S. \*,  $p < 0,05$ . \*\*,  $p < 0,01$ . \*\*\*,  $p < 0,001$  respecto a células tratadas con INDO.  $\alpha$ ,  $p < 0,01$  respecto a células tratadas con PBS. ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Se observó un patrón de protección similar cuando se analizó la capacidad BZFs, mezclas FLox y flavonoides para proteger contra la inhibición de la reducción de MTT inducida por indometacina (Figura 17). Se aprecia que los efectos protectores de las mitocondrias y de las células por parte de FL, FLox y BZF aisladas se observaron en las mismas concentraciones a las que cada uno de estos tratamientos ejercen sus efectos antioxidantes de protección de 80% antes definidos en el objetivo 2 y 6.

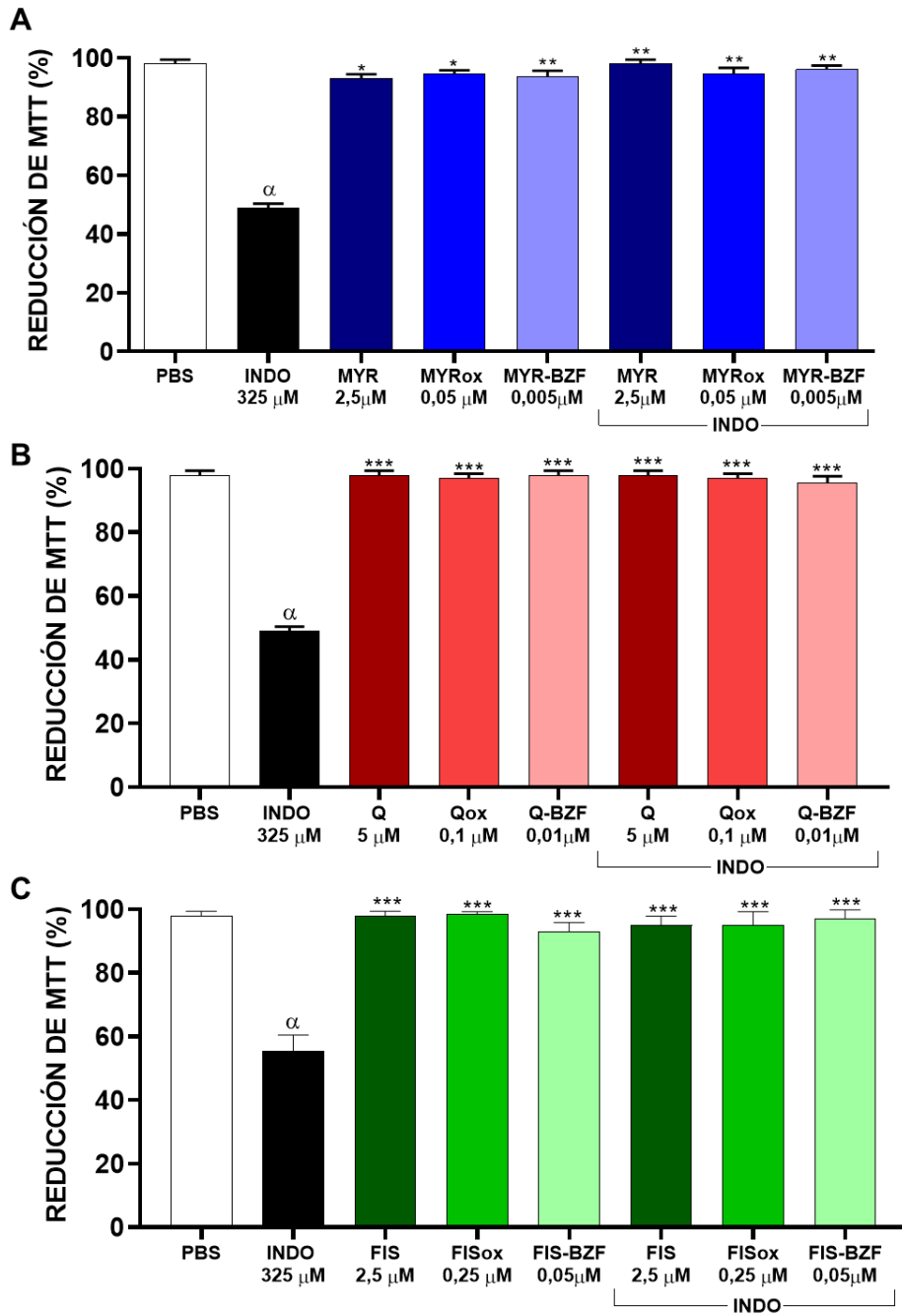
En cuanto a la elevación del tono oxidativo inducida por indometacina en células Caco-2, se cree que dicho efecto es el resultado principalmente del aumento en ROS que resulta de la disfunción mitocondrial inducida por dicho agente, y que en última instancia puede conducir a la apoptosis (Mazumder *et al.*, 2019).

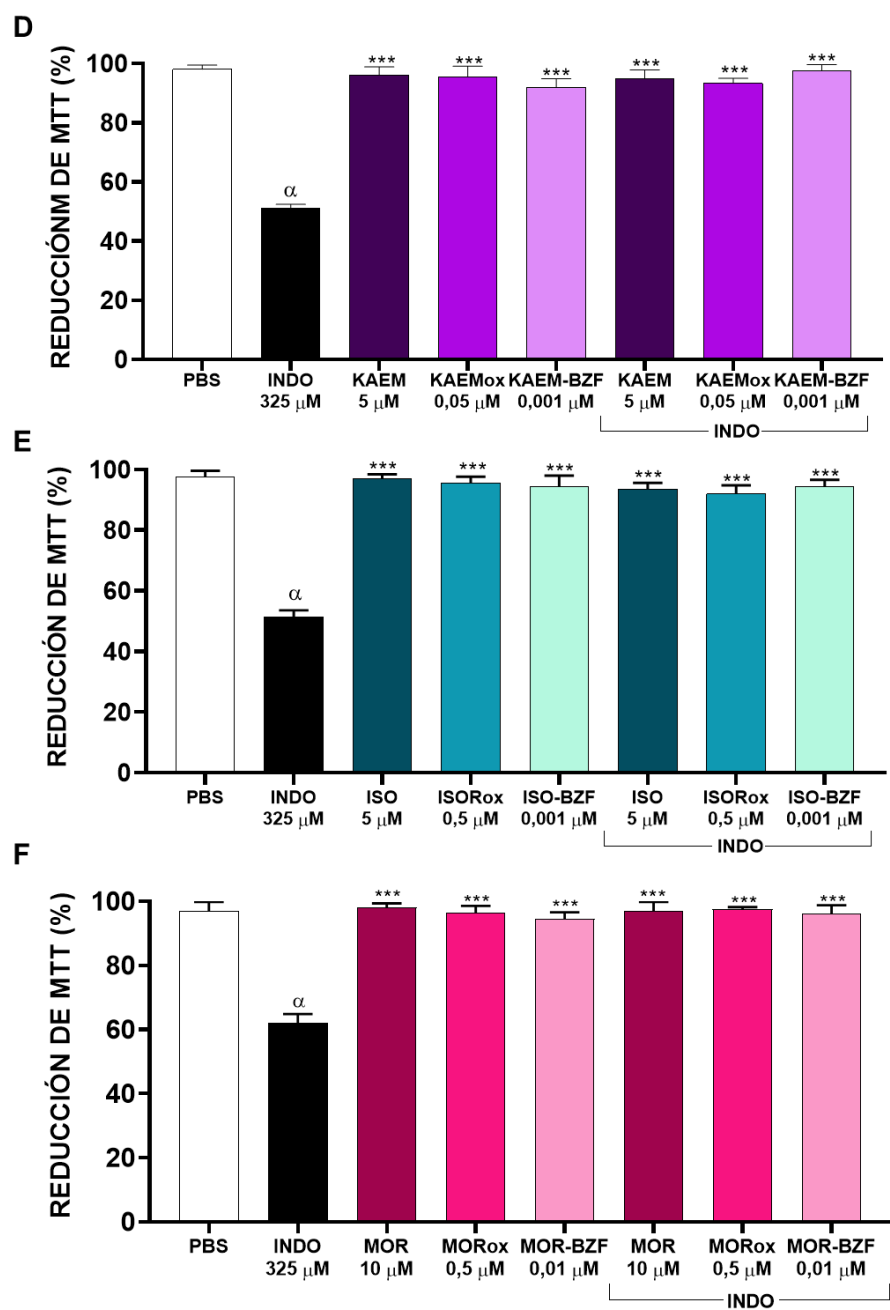
Aún se desconoce el mecanismo molecular responsable de los efectos antioxidantes y citoprotectores de los BZF contra el daño inducido por INDO. Sin embargo, la potencia de los BZF en este estudio (es decir, concentraciones de orden nanomolar) lo diferencia de estudios anteriores que utilizaron concentraciones de flavonoides (ya sea puros o extraídos) en el orden micromolar (Carrasco-Pozo *et al.*, 2011; Hatware *et al.*, 2018). En este estudio se muestra que, en relación con los flavonoides, las BZF son capaces de ejercer igual protección a hasta una concentración 5000 veces menor (caso KAEM-BZF comparando las  $EC_{80}$  del flavonoide versus  $CE_{80}$  de su BZF). Tal magnitud de diferencia no sería atribuible a una diferencia de 5000 veces en

la capacidad depuradora de ROS, ya que cada BZF y su flavonoide de origen no difieren en el número y posición de sus residuos fenólicos (en anillos A y B) (Jørgensen *et al.*, 1998, Atala *et al.*, 2017). Además, BZF carece del doble enlace del anillo C necesario para deslocalizar el electrón desapareado de las semiquinonas (Van Acker *et al.*, 1996). Por lo tanto, no sorprendería que las BZF tengan una capacidad menor que la quercetina para capturar radicales hidroxilos (Gulsen *et al.*, 2007), siendo razonable inferir que las BZF no estarían actuando primariamente como un atrapador de ROS.

Los resultados de este estudio sobre los efectos antioxidantes y citoprotectores de las BZF sugieren otra posible implicación biológica. Después de la absorción celular, la quercetina o sus análogos estructurales pueden sufrir una reacción de oxidación que genera el metabolito benzoil-benzofuranona. Si esto ocurre, la actividad antioxidante del flavonoide podría incrementarse sustancialmente, de manera similar a lo que se observó con la BZF de quercetina.







**Figura 17. Comparación de la capacidad de flavonoides, FLox y BZF aisladas en proteger a células Caco-2 contra el decaimiento en la reducción de MTT por indometacina (INDO).** En los gráficos se muestra los tratamientos relacionados con: miricetina (A), quercetina (B), fisetina (C), kaempferol (D), isoramnetina (E) y morina (F). Los datos se presentan como media  $\pm$  D.S. \*,  $p < 0,05$ . \*\*,  $p < 0,01$ . \*\*\*,  $p < 0,001$  respecto a células tratadas con INDO.  $\alpha$ ,  $p < 0,01$  respecto a células tratadas con PBS. ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

### 5.5.3 Índices de amplificación antioxidante y relaciones estructura actividad

Las capacidades antioxidantes de los seis flavonoles que generan el metabolito tipo BZF tras ser oxidado, su respectiva mezcla de metabolitos obtenidos luego de la oxidación completa del flavonoide (FLox) y su BZF aislada se resumen en la Tabla 4. Se muestran las concentraciones efectivas para proteger las células del daño oxidativo en un 80% (CE<sub>80</sub>).

**TABLA 4. Índices de amplificación antioxidante**

Flavonoide	Flavonoide (CE <sub>80</sub> )	Mezclas oxidativas de flavonoides (FLox) (CE <sub>80</sub> )	BZF (CE <sub>80</sub> ) Conc. equivalentes	BZF (CE <sub>80</sub> ) Conc.reales	FLox vs. Flavonoide	BZF vs. Flavonoide
Miricetina	2,5 µM	0,05 µM*	0,005 µM		50-veces	500-veces
Quercetina	5 µM	0,1 µM*	0,021 µM	0,01 µM	50-veces	500-veces*
Fisetina	2,5 µM	0,25 µM*	0,05 µM		10-veces	50-veces
Kaempferol	5 µM	0,05 µM*	0,041 µM	0,001 µM	100-veces	5000-veces*
Isoramnetina	5 µM	0,1 µM*	0,005 µM		50-veces	1000-veces
Morina	7,5 µM	0,5 µM*	0,01 µM		15-veces	750-veces

\*Índice de amplificación antioxidante calculado utilizando la concentración real de las BZF obtenidas mediante una curva de calibración.

Con los resultados obtenidos se establecieron índices de amplificación de antioxidante, para en primer lugar, expresar la ganancia de antioxidante en función de la degradación oxidativa, es decir, cuando el flavonoide es sometido a oxidación total (FLox vs FL), se genera este índice relacionando la  $CE_{80}$  del flavonoide en el ensayo de capacidad antioxidante celular con la  $CE_{80}$  del FLox en el mismo ensayo (resultados obtenidos en Obj. 2).

Tras ser sometidos a oxidación en medio alcalino el índice de amplificación para los flavonoides fue: 50 veces para miricetina, 50 veces para quercetina, 10 veces para fisetina, 100 veces para kaempferol, 50 veces para isoramnetina y 15 veces para morina. En este análisis no se incluyeron los resultados de la capacidad antioxidante de flavonoides taxifolina y dideoxiquercetina ya que, ellos tras ser sometidos a oxidación no amplifican ni retienen sus propiedades antioxidantes. Se observa que para los 6 flavonoides descritos inicialmente amplifican en un orden de magnitud relativamente similar su capacidad antioxidante luego de someterse a un proceso de degradación oxidativa. Dados los resultados obtenidos con los experimentos de sustracción química de las BZF desde cada mezcla FLox, se puede decir a la  $EC_{80}$  del FLox analizado, el efecto de amplificación observado es exclusivamente responsable de las BZF en la composición de estas mezclas de metabolitos.

Ahora para calcular la ganancia en términos antioxidantes de la conversión del flavonoide en su respectiva BZF (BZF vs. FL), se

estableceremos otro índice antioxidante relacionando la  $CE_{80}$  del flavonoide en el ensayo de capacidad antioxidante celular con la  $CE_{80}$  del BZF aislada en el mismo ensayo (resultados obtenidos en Obj. 6).

Se obtienen los siguientes resultados expresados en las veces de amplificación antioxidante de los flavonoides al transformarse en su BZF: para miricetina son 500 veces, para quercetina 500 veces, para fisetina son 50 veces, para kaempferol 5000 veces, para isoramnetina 1000 veces y para morina 750 veces. Estos últimos estudios, además de permitir construir dichos "índices de amplificación de antioxidantes", brindan más apoyo a la confirmación de la hipótesis propuesta de que, después de someterse a oxidación, algunos antioxidantes mejoran, en lugar de perder, su capacidad antioxidante original. Esta es la primera vez que se introduce el concepto de amplificación antioxidante para vincular que, tras sufrir oxidación, determinados flavonoides generan un metabolito que ejerce un efecto marcadamente más potente que su precursor.

Si bien es muy interesante introducir este concepto de amplificación antioxidante, también se deben tener en cuenta las limitaciones de estos índices. Al no poder establecer la concentración real de las BZF de miricetina, fisetina, isoramnetina y morina (sólo se utiliza una expresión de concentración equivalente), entre ellas no se puede llevar a cabo una comparación interflavonoides, es decir, sólo se puede comparar con el respectivo FL y su FLox (intraflavonoide).

De este análisis intra o inter-flavonoide se podría desprender cual sería el flavonoide que más se beneficia del proceso de degradación oxidativa, que, en este caso dentro de los 4 flavonoides antes mencionados, es la isoramnetina. Por el contrario, el flavonoide que menos se beneficia de la oxidación es la fisetina. Sin embargo, esta última observación no considera otras variables que estarían detrás de la acción antioxidante de las BZF. Por ejemplo, el rendimiento molar de formación de las BZF, al no tener la concentración real de estas 4 BZF no podemos saber cuantos moles de BZF se genera por cada mol de consumo del flavonoide y así vincularlo para definir que flavonoide es capaz de producir más BZF. Así mismo, estos índices de amplificación antioxidante presentados dependen también del momento donde se define el FLox. Recordemos que las mezclas de oxidación de los flavonoides son caracterizadas cuando queda en su composición una concentración remanente entre 2 a 4% del flavonoide. Al variar el tiempo de formación de estas mezclas, se variará también su composición, por ejemplo, al obtener una mezcla de oxidación donde se detiene la reacción cuando aún queda el 50% de concentración remanente del flavonoide, esta mezcla podría hipotéticamente tener más cantidad de BZF, por ende, la capacidad antioxidante de esta mezcla sería eventualmente más potente que la mezcla FLox aquí estudiada.

De igual manera, suponiendo que las BZF llegan intactas al interior de la célula donde probablemente ejercen su acción, su actividad dependerá

además de la capacidad de estos metabolitos para atravesar la membrana plasmática hasta el medio intracelular. Eventualmente para la BZF que se atribuya ser la más potente (dentro de esta serie de moléculas) en el ensayo de capacidad antioxidante descrito en esta tesis, este efecto podría estar más ligada a que llega en mayor porcentaje al medio intracelular más que su potencia misma. Muy probablemente las BZF tendrían diferencias en su permeabilidad celular que estarían dado por sus diferencias estructurales.

Por todas estas consideraciones anteriormente expresadas, al momento de interpretar los índices de amplificación antioxidantes se debe ser riguroso y entender que estos están definidos exclusivamente para las condiciones experimentales aquí descritas, ya que además de las variables anteriormente mencionadas, la temperatura, medio de reacción, agente generador de ROS, tipo celular, etc., puede variar significativamente los resultados observados tanto para los flavonoides, FLox y para las BZF aisladas.

Exclusivamente en el caso de Q-BZF y KAEM-BZF se pueden realizar comparaciones interflavonoides. De esta manera se lograría establecer una relación estructura-actividad, ya que para estas BZF se logró determinar una concentración real. Se pudo evidenciar que un ligero cambio estructural, como la ausencia de un hidroxilo en posición 3' del anillo B (KAEM-BZF) aumenta en 10 veces la potencia antioxidante en comparación con Q-BZF, que posee hidroxilos en 3' y 4' en anillo B formando un grupo catecol. Esta ausencia del

OH otorga una mayor hidrofobicidad a KAEM-BZF respecto de Q-BZF, eventualmente esto podría estar vinculado a un mayor paso a través de la membrana celular de KAEM-BZF, y así quizás explicando esta diferencia en las potencias antioxidante entre estas dos BZF. Fang *et al.*, 2017 ha estudiado la permeabilidad de una serie de flavonoides en monocapas de células Caco-2 observando que kaempferol tiene un mayor traspaso desde el lado apical al basolateral (y viceversa), que quercetina; además de una mayor acumulación celular mientras que en este parámetro quercetina no fue detectada intracelularmente. Esto aporta antecedentes a que, quizás lo que estaría detrás de la diferencia en la capacidad antioxidante de las BZF sea su capacidad para ingresar a la célula a ejercer su acción.

La lipofilicidad es una propiedad fisicoquímica crucial para un compuesto farmacológicamente activo, ya que influye en varios aspectos de la eficacia de un fármaco, incluida la solubilidad, la absorción intestinal, la permeabilidad de la membrana, la unión a proteínas plasmáticas, el cruce de la barrera hematoencefálica, la entrada a órganos y el metabolismo/purificación corporal (propiedades ADME) . Esta propiedad normalmente se mide utilizando el coeficiente de partición (LogP). Sin embargo, en el caso de moléculas cargadas, el coeficiente de distribución (D o LogD) es una medida más apropiada para aproximaciones biológicas, que se describe a pH 7,4.

Para contribuir a una visión más completa de las relaciones estructura-



actividad de las BZF estudiadas aquí, a pesar de no poder obtener para todas concentraciones que permitan las comparaciones más concretamente, a través de cálculos de algunas propiedades fisicoquímicas de las BZF inferiremos algunas diferencias que puedan explicar sus diferencias en capacidad AOX. Chemicalize fue utilizado para la predicción de propiedades fisicoquímicas (LogP, LogD, pK<sub>a</sub> y solubilidad) <https://chemicalize.com/>, desarrollado por ChemAxon.

**Tabla 5:** Propiedades fisicoquímicas de las BZF en estudio. Calculadas por Chemicalize, software desarrollado por ChemAxon.

BZF derivada de	Log P	Log D <sub>7.4</sub>	pKa	Solubilidad en agua (mg/mL)
Miricetina	1,92	1,23	7,01	5,89
Quercetina	2,22	1,76	7,27	1,22
Fisetina	1,88	1,40	7,25	0,44
Kaempferol	2,53	2,02	7,21	0,48
Isoramnetina	2,37	2,00	7,37	0,40
Morina	2,87	2,38	7,24	1,29

Un modelo predictivo influyente para la absorción intestinal es la "regla de 5 de Lipinski". Compuestos que son probablemente absorbibles a través de los intestinos no contienen más de 5 donantes de enlaces H, 10 aceptores de enlaces H, tienen un peso molecular de <500 Da y logP <5. De acuerdo con esta regla, los flavonoides, con números más altos de hidroxilo son menos propensos a ser absorbidos a través de los intestinos. Por el contrario, los flavonoides metoxilados, como isoramnetina, pierden propiedades de

aceptor/donador de enlaces H y tienen valores de logP más altos, lo que los hace altamente absorbibles. Si observamos los valores de LogD a pH 7,4 de la Tabla 5 vemos la BZF de isoramnetina está dentro de un grupo de BZF que los valores más alto para este parámetro. Esto podría explicar que esta BZF sea la que tenga un índice de amplificación antioxidante mayor ya que si hacemos un ranking de estos índices en base a las concentraciones equivalentes obtenidas para las 6 BZF en estudio, Q-BZF y K-BZF exhibirían un índice de amplificación de 238 y 122 veces, respectivamente, dejando en el primer lugar a ISO-BZF.

Al comparar MOR-BZF que tiene sustitución de grupo hidroxilo tanto el carbono 2' como el carbono 4' (grupo resorcinol) tiene el valor LogD más alto, esto podría indicar un paso favorable a través de las membranas celular ya que el flavonoide precursor mostró una mejor absorción cuando se comparó con kaempferol que tiene sustitución de -OH solo en el carbono 4' del anillo B (Fang *et al.*, 2017). Estos resultados podrían sugerir que la sustitución por un grupo electronegativo (como un grupo hidroxilo) en el carbono 3' es desfavorable para la absorción de flavonoides (y consecuente, sus respectivas BZF) mientras que la sustitución por el carbono adyacente 2' y 4') favorecería la absorción.

No hay grandes diferencias entre los valores de pKa obtenidos para las distintas BZF evaluadas. Las propiedades ácido-base muestran que los radicales de las BZF son neutros en un medio ácido y con una carga negativa

alrededor de pH 7, similar al comportamiento de los flavonoides originales.

En cuanto a la solubilidad, vemos que la BZF más soluble en medios acuosos es la MYR-BZF ya que es molécula que contiene más grupos -OH en su estructura, sin embargo, es esta misma característica la que afecta a su lipofilidad, probablemente esta molécula exhibiría una menor permeabilidad celular que su compuesto hermano Q-BZF.

Desde un punto de vista de requerimientos estructurales para ejercer actividades antioxidantes directas, se ha reportado que la asociación de un grupo -OH en posición 5 en el anillo A de un flavonoide a menudo proporciona un enlace de hidrógeno en conjunto con la combinación del grupo 4-carbonilo, esto sumado al doble enlace C2-C3 u otros grupos donantes de electrones hace que se deslocalice eficientemente el electrón desapareado del anillo B, lo cual se ha reportado que mejora significativamente la actividad antioxidante de flavonoides (Amic *et al.*, 2007). Por ejemplo, la BZF de fisetina al no poseer este -OH en posición 4 (relativa al esqueleto de las BZF) podría tener menos capacidad de deslocalizar el electrón desapareado a través de su estructura.

De momento no se ha encontrado una propiedad que se correlacione favorablemente con el ranking de índices antioxidantes aquí descrito. Para establecer relaciones estructura actividad que puedan explicar más fehacientemente la diferencia en los resultados de amplificación antioxidante ejercida por las BZF estudiadas en este trabajo, se precisa trabajar en generar a mayor escala estos compuestos para poder establecer concentraciones

reales de las BZF de miricetina, fisetina, isoramnetina y morina.

## 5.6 Resultados relaciones con experimentos adicionales

### 5.6.1 Análisis por resonancia magnética nuclear de Q-BZF.

La identidad de la BZF derivada de quercetina (Q-BZF) fue analizada por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR. Los resultados obtenidos para RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 5.90 (d,  $J = 2$  Hz, 1H, H-6); 5.95 (d,  $J = 2$  Hz, 1H, H-8); 6.79 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, H-5); 7.52–7.55 (m,  $J = 1.90$  Hz, 2H, H-2' and H-6'). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 90.34 (C-8); 96.38 (C-6); 100.48 (C-4a); 104.58 (C-3); 114.89 (C-5'); 117.34 (C-2'); 123.81 (C-6'); 125.02 (C-1'); 144.73 (C-3'); 151.36 (C-4'); 158.55 (C-8a); 168.47 (C-5); 171.87 (C-7); 189.86 (C-4); 190.25 (C-2). Estos datos coinciden con lo reportado previamente por Jørgensen et al. (1998) para el producto de oxidación de quercetina (2-(3,4-dihidroxibenzoil)-2,4,6-trihidroxi-3(2H)-benzofuranona). Espectros se muestran en ANEXO IV.

### **5.6.2 Comparación de la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) por las BZF aisladas derivadas de quercetina (Q-BZF) y kaempferol (KAEM-BZF), con sus respectivos flavonoides precursores.**

Para comenzar a aproximarnos a comprender el mecanismo por el cual las BZF ejercen su acción antioxidante y citoprotectora, se puso atención al mecanismo por el cual indometacina ejerce sus efectos deletéreos en células. Además de exacerbar el estrés oxidativo, este AINE es capaz de inducir la activación del factor nuclear pro-oxidante y pro-inflamatorio kappa B en células Caco-2 expuestas a este agente (Fuentes *et al.*, 2021). Hay muchas fuentes intracelulares diferentes de ROS que son capaces de influir o ser influenciadas por la actividad de NF- $\kappa$ B (Morgan *et al.*, 2011).

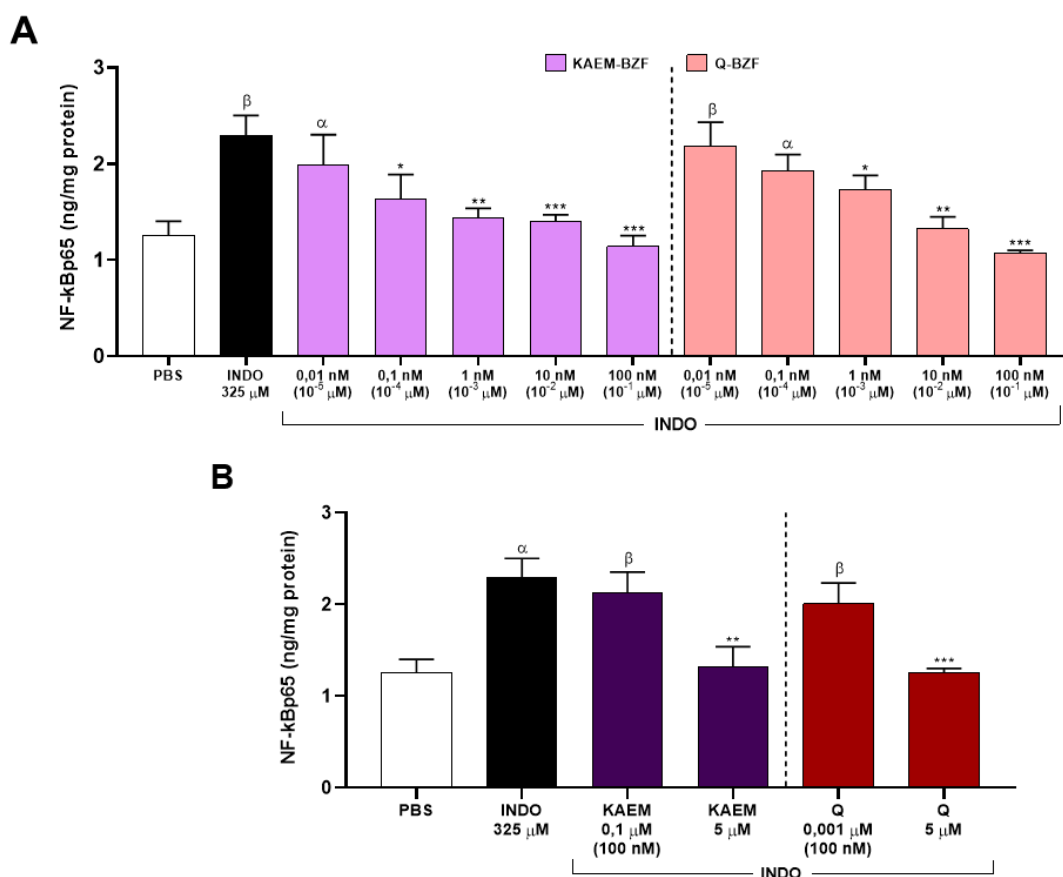
Se decidió testear la benzofuranona derivada de KAEM ya que demostró obtener el mayor índice de amplificación antioxidante al compararla con su flavonoide de origen, y además porque con esta BZF fue posible realizar una curva de calibración que permitió obtener concentraciones reales de este compuesto, de este modo se pueden establecer comparaciones con la actividad de la Q-BZF para modular la activación de NF- $\kappa$ B.

La cuantificación de NF- $\kappa$ B  $p65$  en los extractos nucleares de células Caco-2 fue usada para estimar la activación de este factor nuclear por indometacina, la concentración de NF- $\kappa$ B  $p65$  se incrementa en un 90% en las células tratadas con indometacina comparado con las células tratadas con

PBS (control). Los datos que se muestran en la figura 18A, confirman con lo reportado anteriormente, la capacidad de 0,1  $\mu\text{M}$  de Q-BZF para prevenir la activación de NF- $\kappa\text{B}$  (Fuentes *et al.*, 2021). A esta concentración, quercetina no pudo promover tal efecto. Sin embargo, se logró una protección total cuando se agregó quercetina a las células a 5  $\mu\text{M}$  (Figura 18B).

La figura 18A también se muestra que KAEM-BZF es capaz de inhibir la activación de NF- $\kappa\text{B}$  en cerca de un 62 % y un 86 % a  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$   $\mu\text{M}$ , respectivamente. A una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$  kaempferol no ejerció ningún efecto sobre NF- $\kappa\text{B}$ , pero si se observó una inhibición del 100% de su activación a 5  $\mu\text{M}$  por parte del flavonoide (Figura 18B). Cuando se compararon ambas BZF, el efecto inhibitorio máximo de KAEM-BZF sobre NF- $\kappa\text{B}$  se observó a una concentración 100 veces menor. Dado que este último valor no difiere del que surge después de comparar las concentraciones de KAEM-BZF y Q-BZF necesarias para alcanzar sus efectos antioxidantes máximos, es tentador especular que la inhibición de la activación de NF- $\kappa\text{B}$  por estos BZF podría ser la base sus efectos antioxidantes. Ambas BZF exhiben un comportamiento concentración dependiente. Con estos resultados se valida en cierta manera, a través de otra metodología, la amplificación ahora en términos de potencial anti-inflamatorio de los flavonoides quercetina y kaempferol al convertirse en sus respectivas BZF (Speisky *et al.*, 2023)

Cabe señalar que el impacto de la indometacina en NF- $\kappa\text{B}$  ha sido objeto de debate. De hecho, se ha sugerido que este agente no es capaz de provocar



**Figura 18. Comparación de efectos en la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) inducidos por indometacina (INDO) en células Caco-2 por parte de (A) KAEM-BZF versus Q-BZF y también por los (B) flavonoides kaempferol (KAEM) y quercetina (Q). La subunidad NF- $\kappa$ B p65 se evaluó en su núcleo. Los datos se presentan como media  $\pm$  D.S. \*,  $p < 0,05$ . \*\*,  $p < 0,01$ . \*\*\*,  $p < 0,001$  respecto a células tratadas con INDO.  $\alpha$ ,  $p < 0,01$ .  $\beta$ ,  $p < 0,001$  respecto a células tratadas con PBS. ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.**

alteraciones en el mediador inflamatorio cuando se prueba a concentraciones de 10  $\mu$ M o 25  $\mu$ M, según un estudio realizado por Yamamoto *et al.* en 1999. Teniendo en cuenta que las concentraciones plasmáticas de indometacina normalmente alcanzan alrededor de 10  $\mu$ M después de la administración farmacológica, según los hallazgos de Hvidberg *et al.* en 1972,

se puede suponer que el efecto de activación de NF- $\kappa$ B de la indometacina a 325  $\mu$ M, como se observa en este estudio, se encuentra dentro de un rango de concentración relevante para sus efectos citotóxicos, según Little *et al.* en 2007.

A lo largo de este trabajo hemos introducido la idea de que la probabilidad que las BZF actúen a través de un mecanismo antioxidante indirecto está por sobre la capacidad que tendrían las BZF para atrapar ROS directamente. Hemos mencionado también que estos probables mecanismos indirectos, podrían ser, por ejemplo, la activación del factor transcripcional Nrf2. El estudio de Vásquez-Espinal *et al.* en 2019 utilizó cálculos de acoplamiento molecular para comparar la estabilidad de la interacción de Q-BZF y quercetina con el dominio regulador Nrf2 en el citosol. Descubrieron que para Q-BZF era más favorable esta interacción, lo que sugiere que el metabolito generado después de la oxidación de la quercetina podría ser un mejor inhibidor de la interacción entre Nrf2 y su secuestrador citosólico. En cuanto a la inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B, los datos obtenidos en esta tesis sugieren que por esta vía se podrían explicar alguno de los efectos antioxidantes de las BZF. Las BZF pudiesen estar previniendo la activación de NF- $\kappa$ B mediada por aquellas proteínas quinasas C que son activables por ROS y que fosforilan a la MAPK p38, la cual a su vez activaría NF- $\kappa$ B (Cosentino-Gomes *et al.*, 2012). Sin embargo, también existe la posibilidad de que la molécula de BZF esté actuando por un mecanismo antioxidante-independiente, en forma directa



inhibiendo la activación de NF- $\kappa$ B, o bien, indirectamente la de aquellas enzimas que activan dicho factor nuclear, como es el caso de la PKC Zeta, isoforma atípica que es activada por INDO (Mazumder *et al.*, 2019).

Dado que la activación de NF- $\kappa$ B es un factor causal significativo en la patogenia de múltiples enfermedades inflamatorias crónicas (Park *et al.*, 2016; Sehnert *et al.*, 2020), la capacidad de Q-BZF y KAEM-BZF para prevenir la activación de NF- $\kappa$ B abre la posibilidad de considerar la exploración del potencial terapéutico de BZF en este tipo de enfermedades.

Se espera que los hallazgos descritos en esta tesis doctoral contribuyan no sólo a ampliar la perspectiva sobre las posibles implicaciones antioxidantes asociadas con la oxidación de flavonoides distintos de la quercetina, sino también a abrir la posibilidad de definir el esqueleto básico de BZF como una posible estructura base superior para el posterior desarrollo y/o diseño de nuevas moléculas antioxidantes.

## 6. CONCLUSIONES

Ante la hipótesis sobre si determinados flavonoides conservan o potencian sus propiedades antioxidantes tras sufrir oxidación, la evidencia presentada en esta tesis revela que, al menos en el caso de flavonoides con determinadas características estructurales, las mezclas de metabolitos resultantes de su oxidación no sólo conservan, si no que amplifican en distinto grado, la capacidad de protección frente al aumento del estrés oxidativo celular inducido por indometacina, comparado con precursores no oxidados.

Esta amplificación del efecto antioxidante acompañado con un efecto citoprotector en las mezclas de oxidación de flavonoides es atribuible exclusivamente a la generación de un metabolito tipo benzoil-benzofuranona tras este proceso de degradación. Este metabolito difiere frente al flavonoide de origen, esencialmente en el anillo C que pasa de un anillo pirano de seis átomos a un anillo furano de 5 átomos.

Se lograron aislar e identificar seis BZF derivadas de los flavonoides miricetina, quercetina, fisetina, kaempferol, isoramnetina y morina, destacando el reporte por primera vez de la formación del metabolito BZF proveniente desde isoramnetina. Estas BZF aisladas demostraron amplificar en gran medida, la capacidad antioxidante frente a sus flavonoides de origen, siendo esta amplificación en un rango sorprende rango, entre 100 y hasta 5000 veces.

Los requerimientos estructurales que se han definido, a partir de los

resultados de este trabajo, para que un flavonoide amplifique su capacidad antioxidante celular mediante la formación de un metabolito tipo BZF son: que en su estructura flavan incluya un doble enlace entre C2-C3, un hidroxilo en C3 y un grupo ceto en C4 (es decir que constituyan un flavonol) y al menos un hidroxilo en el anillo B y al menos otro hidroxilo en anillo A. Este último requerimiento en el anillo A no estaba contemplado al inicio, pero los resultados obtenidos con el flavonoide dideoxiquercetina han demostrado que la hidroxilación en este anillo tiene relevancia a la hora de generar el respectivo metabolito BZF tras el proceso de degradación oxidativa en medio alcalino.

Un punto importante para destacar de este trabajo fue la introducción por primera vez del concepto de índice de amplificación antioxidante, para expresar en un valor la ganancia antioxidante de un flavonoide tras ser sometido a un proceso oxidativo y generar a las BZF como metabolito que responsable de esta amplificación antioxidante. Como señalamos, estos índices deben ser analizados cuidadosamente para las condiciones experimentales aquí empleadas.

Si bien no fue posible establecer y vincular todas las relaciones estructura-actividad planteadas entre las BZF estudiadas por la imposibilidad de obtener concentraciones reales de cuatro de estos compuestos, fue posible cuantificar la diferencia en potencia antioxidante con la ausencia de un hidroxilo en el anillo B en posición 3' (KAEM-BZF vs Q-BZF), generándose un aumento en 10 veces en capacidad antioxidante con este cambio estructural. Se discuten

también algunos aspectos fisicoquímicos que podrían estar detrás de las diferencias en la acción antioxidante de estos compuestos.

El uso de AINE como agentes generadores de ROS ha abierto la posibilidad de proyectar el uso potencial de las BZF para proteger contra algunos de los efectos gastrointestinales adversos más graves asociados con el uso de AINE, como indometacina. Aunque los mecanismos exactos subyacentes al efecto protector de la capacidad antioxidante y citoprotectora de las BZF aún no se han dilucidado totalmente, según los resultados aportados y antecedentes presentados en esta tesis, las BZF podrían estar previendo el daño mitocondrial que conlleva al aumento de la producción de ROS en la exposición de las células a indometacina o previendo la activación del factor pro-oxidante y pro-inflamatorio *Nf- $\kappa$ B*. Esta capacidad podría extenderse a las otras BZF presentadas en este estudio para ameritar una mayor evaluación bajo diversas condiciones en las que el control del estrés oxidativo y/o la prevención de la activación de *NF- $\kappa$ B* parecen ser importantes para la prevención de ciertas patologías. Aportando a esta proyección, complementariamente se demostró la capacidad de KAEM-BZF para inhibir la activación de *NF- $\kappa$ B* en células Caco-2 tratadas con indometacina.

Como futuras perspectivas derivadas de los datos aquí expuestos se apunta a investigar si la generación del metabolito tipo BZF ocurre *in situ* en células normales o expuestas a ROS, esto aportaría más evidencia para comprender los mecanismos que subyacen los poderosos efectos en salud

que ha demostrado el consumo de flavonoides y que no pueden ser explicados por los niveles alcanzados en concentración plasmática tras la ingesta de alimentos ricos en estos compuestos.

También sería muy deseable poder establecer una forma de obtención de mayor escala de las BZF que promueva distintas a la proveniente de quercetina, para realizar estudios de RMN que ayuden a confirmar más robustamente la identidad estructural de estos metabolitos y que, además permitan realizar metodologías para cuantificar precisamente estos compuestos.

Dado lo reportado por nuestro laboratorio para el caso de Q-BZF, al encontrarse una fuente natural de este compuesto en capas externas de piel de cebolla y chalota, sería de interés extender la búsqueda e identificación de otras BZF en especies vegetales, ya que esto puede aportar un valor agregado a la o las especies que produjesen este metabolito y eventualmente llevar al desarrollo de “nutracéuticos”.

Finalmente, se espera que los resultados aportados con esta tesis permitan abrir la posibilidad de definir el esqueleto básico de las BZF como una posible estructura base para el posterior desarrollo y/o diseño de nuevas moléculas antioxidantes y citoprotectoras con potencial anti-inflamatorio.

## 7. PRODUCTIVIDAD

### PUBLICACIONES

Arias-Santé, M. F., Fuentes J., Ojeda C., Aranda M., Pastene E., Speisky H. Amplification of the antioxidant properties of myricetin, fisetin, and morin following their oxidation. *Food Chemistry*. En revisión

Speisky, H., Arias-Santé, M. Fuentes F., Fuentes, J. 2023. Oxidation of Quercetin and Kaempferol Markedly Amplifies Their Antioxidant, Cytoprotective, and Anti-Inflammatory Properties. *Antioxidants*, 12(1), 155.

de Camargo, A. C., Concepción Alvarez, A., Arias-Santé, M. F., Oyarzún, J. E., Andia, M. E., Uribe, S, Bridi, R. 2022. Soluble Free, Esterified and Insoluble-Bound Phenolic Antioxidants from Chickpeas Prevent Cytotoxicity in Human Hepatoma HuH-7 Cells Induced by Peroxyl Radicals. *Antioxidants*, 11(6), 1139.

Fuentes, J., Arias-Santé, M. F., Atala, E., Pastene, E., Kogan, M. J., & Speisky, H. 2020. Low nanomolar concentrations of a quercetin oxidation product, which naturally occurs in onion peel, protect cells against oxidative damage. *Food chemistry*, 314, 126166.

### PATENTE EN EVALUACIÓN

En el año 2019, junto a mi director de tesis, la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Chile y otros investigadores del Laboratorio de Antioxidantes del INTA enviamos una solicitud de patente a INAPI que tiene por título: "Extracto de piel de cebolla con propiedades protectoras de la mucosa gastro-intestinal contra el daño inducido por fármacos anti-inflamatorios no esteroidales o por alcohol, composición farmacéutica o alimenticia que lo comprende, método de obtención y uso para prevenir, tratar y/o mitigar los efectos adversos de AINES o alcohol".

### PRESENTACIÓN A CONGRESOS

Autora y presentadora de la comunicación oral en el 14° Simposio Latino Americano de Ciencia de los Alimentos realizado entre el 12 al 14 de diciembre 2021 modalidad online. Autores: M. Fernanda Arias-Santé, Jocelyn Fuentes, Adriano Costa de Camargo, Mario Aranda, Hernán Speisky. Título de la presentación: "Oxidation of certain flavonoids substantially amplifies their

intracellular antioxidant capacities."

Autora y presentadora de Póster en III Jornada de Estudiantes de Postgrado del INTA realizado el 05 de diciembre en Santiago, Chile de 2019. Autores: M. Fernanda Arias-Santé, Jocelyn Fuentes, Edgar Pastene, Mario Aranda, Elías Átala, Hernán Speisky. Título de mi póster: ¿Un flavonoide que se somete a oxidación pierde su capacidad antioxidante?. Este trabajo fue premiado con el Primer Lugar en esta Jornada.

Autora de Presentación Oral en el First Workshop on Natural Products Chemistry and its Applications realizado en la Universidad del Bio Bio entre 25-27 de noviembre 2019 en Chillán, Chile. Autores: M. Fernanda Arias-Santé, Jocelyn Fuentes, Edgar Pastene, Mario Aranda, Elías Átala E., Hernán Speisky. Título de mi presentación: The oxidation of food-occurring flavonoids increases substantially their original antioxidant properties.

Autora y presentadora de Póster en el Encuentro de Polifenoles II realizado en la Universidad de Santiago de Chile el 30 de agosto de 2019 en Santiago, Chile. Autores: M. Fernanda Arias-Santé, Jocelyn Fuentes, Edgar Pastene, Mario Aranda, Elías Átala, Hernán Speisky. Título de mi póster: Benzofuranonas derivadas de la oxidación de flavonoides. ¿una generación de nuevos y altamente potentes antioxidantes?

Autora y presentadora de Póster en el XL Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, SOFARCHI 2018, realizado entre el 13 y el 16 de noviembre de 2018 en Santa Cruz, Provincia de Colchagua, Región de O'Higgins, Chile. Autores: M. Fernanda Arias-Santé, Jocelyn Fuentes, Elías Atala, Hernán Speisky. Título del póster: "Do flavonoids loss their antioxidant properties after undergoing oxidation?".

## 8. REFERENCIAS

- Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucic, B., Trinajstic, N. 2007. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current medicinal chemistry*, 14(7), 827-845.
- Átala, E., Fuentes, J., Wehrhahn, M.J., Speisky, H. 2017. Quercetin and related flavonoids conserve their antioxidant properties despite undergoing chemical or enzymatic oxidation. *Food Chemistry*. 234, 479-485.
- Awad, H.M., Boersma, M.G., Boeren, S., van Bladeren, P.J., Vervoort, J., Rietjens, I.M. 2001. Structure-activity study on the quinone/quinone methide chemistry of flavonoids. *Chemical Research Toxicology* 14:4, 398-408.
- Bernardi, S., Del Bo', C., Marino, M., Gargari, G., Cherubini, A., Andrés-Lacueva, C., Riso, P. 2019. Polyphenols and intestinal permeability: rationale and future perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68(7), 1816-1829.
- Bindu, S., Mazumder, S., Dey, S., Pal, C., Goyal, M., Alam, A., Bandyopadhyay, U. 2013. Nonsteroidal anti-inflammatory drug induces proinflammatory damage in gastric mucosa through NF- $\kappa$ B activation and neutrophil infiltration: Anti-inflammatory role of heme oxygenase-1 against nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Free Radical Biology and Medicine* 65, 456-467.
- Birringer, M. 2011. Hormetics: dietary triggers of an adaptive stress response. *Pharmaceutical research* 28, 2680-2694.
- Boesten, D. M., von Ungern-Sternberg, S. N., den Hartog, G. J., & Bast, A. 2015. Protective pleiotropic effect of flavonoids on NAD<sup>+</sup> levels in endothelial cells exposed to high glucose. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 343-355). *Academic Press*.



- Brett, A. M. O., Ghica, M. E. 2003. Electrochemical oxidation of quercetin. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis* 15(22), 1745-1750.
- Calabrese, E. J., Bachmann, K. A., Bailer, A. J., Bolger, P. M., Borak, J., Cai, L., Mattson, M. P. 2007. Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology* 222(1), 122-128.
- Carrasco-Pozo, C., Gotteland, M., Speisky, H. 2011. Apple peel polyphenol extract protects against indomethacin-induced damage in Caco-2 cells by preventing mitochondrial complex I inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 11501–11508.
- Carrasco-Pozo, C., Speisky, H., Brunser, O., Pastene, E., Gotteland, M. 2011. Apple peel polyphenols protect against gastrointestinal mucosa alterations induced by indomethacin in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(12), 6459-6466.
- Carrasco-Pozo, C., Castillo, R. L., Beltrán, C., Miranda, A., Fuentes, J., Gotteland, M. 2016. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: role of NF- $\kappa$ B and Nrf2. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 27, 289-298.
- Chedea, V. S., Choueiri, L., Jisaka, M., & Kefalas, P. 2012. O-Quinone involvement in the prooxidant tendency of a mixture of quercetin and caffeic acid. *Food chemistry*, 135(3), 1999-2004.
- Chen, X.; Zhong, Z.; Xu, Z.; Chen, L.; Wang, Y. 2010. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: forty years of application and controversy. *Free Radical Research* 44, 587–604.

Choi, E. J., Chee, K. M., Lee, B. H. 2003. Anti-and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *European Journal of Pharmacology*, 482(1-3), 281-285.

Cosentino-Gomes, D., Rocco-Machado, N., Meyer-Fernandes, J. R. 2012. Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation. *International Journal of Molecular Sciences* 13(9), 10697-10721.

D'Andrea, G. 2015. Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications?. *Fitoterapia* 106, 256-271.

Di Meo, F., Lemaur, V., Cornil, J., Lazzaroni, R., Duroux, J. L., Olivier, Y., Trouillas, P. 2013. Free radical scavenging by natural polyphenols: atom versus electron transfer. *The Journal of Physical Chemistry A*, 117(10), 2082-2092.

Diaz-Vegas, A., Sanchez-Aguilera, P., Krycer, J. R., Morales, P. E., Monsalves-Alvarez, M., Cifuentes, M., Lavandero, S. 2020. Is mitochondrial dysfunction a common root of noncommunicable chronic diseases? *Endocrine reviews*, 41(3).

Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Kensler, T. W. 2005. The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chemical Research in Toxicology* 18(12), 1779-1791.

Dinkova-Kostova, A. T., Talalay, P. 2008. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Molecular Nutrition & Food Research* 52(S1), S128-S138.

Fang, Y., Cao, W., Xia, M., Pan, S., Xu, X. 2017. Study of structure and permeability relationship of flavonoids in Caco-2 cells. *Nutrients*, 9(12), 1301.

Fuentes, J., Atala, E., Pastene, E., Carrasco-Pozo, C., Speisky, H. 2017. Quercetin oxidation paradoxically enhances its antioxidant and cytoprotective properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(50), 11002-11010.

Fuentes, J., Arias-Santé, M. F., Atala, E., Pastene, E., Kogan, M. J., Speisky, H. 2020. Low nanomolar concentrations of a quercetin oxidation product, which naturally occurs in onion peel, protect cells against oxidative damage. *Food Chemistry* 314, 126166.

Fuentes, J., de Camargo, A. C., Atala, E., Gotteland, M., Olea-Azar, C., Speisky, H. 2021. Quercetin oxidation metabolite present in Onion peel protects Caco-2 cells against the oxidative stress, NF-kB activation, and loss of epithelial barrier function induced by NSAIDs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69(7), 2157-2167.

Fuentes, J., Brunser, O., Atala, E., Herranz, J., de Camargo, A. C., Zbinden-Foncea, H., Speisky, H. 2022. Protection against indomethacin-induced loss of intestinal epithelial barrier function by a quercetin oxidation metabolite present in onion peel: In vitro and in vivo studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 100, 108886.

Forman, H. J., Davies, K. J., Ursini, F. 2014. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 24-35.

Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J. X., O'Brien, P. J. 2002. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*, 177(1), 91-104.

Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. 2010. Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501(1), 23-30.

Gülşen, A., Makris, D. P., Kefalas, P. 2007. Biomimetic oxidation of quercetin: Isolation of a naturally occurring quercetin heterodimer and evaluation of its in vitro antioxidant properties. *Food Research International* 40(1), 7-14.

Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences* 899(1), 136-147.

Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J. F., Flamm, G. W., Williams, G. M., Lines, T. C. 2007. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology* 45(11), 2179-2205.

Hatware, K. V., Sharma, S., Patil, K., Shete, M., Karri, S., Gupta, G. 2018. Evidence for gastroprotective, anti-inflammatory and antioxidant potential of methanolic extract of *Cordia dichotoma* leaves on indomethacin and stress induced gastric lesions in Wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 103, 317-325.

Heřmánková, E., Zatloukalová, M., Biler, M., Sokolová, R., Bancířová, M., Tzakos, A. G., Vacek, J. 2019. Redox properties of individual quercetin moieties. *Free Radical Biology and Medicine* 143, 240-251.

Hollman, P. C., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., Vidry, S. 2011. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *The Journal of Nutrition* 141(5), 989S-1009S.

Hussain, T., Tan, B., Murtaza, G., Liu, G., Rahu, N., Kalhor, M. S., Yin, Y. 2020. Flavonoids and type 2 diabetes: Evidence of efficacy in clinical and animal studies and delivery strategies to enhance their therapeutic efficacy. *Pharmacological Research* 152, 104629.

Hvidberg, E., Lausen, H. H., Jansen, J. A. 1972. Indomethacin: plasma concentrations and protein binding in man. *European Journal of Clinical Pharmacology* 4(2), 119-124.

- Ji, L. L., Sheng, Y. C., Zheng, Z. Y., Shi, L., Wang, Z. T. 2015. The involvement of p62–Keap1–Nrf2 antioxidative signaling pathway and JNK in the protection of natural flavonoid quercetin against hepatotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 85, 12-23.
- Jodynis-Liebert, J., & Kujawska, M. 2020. Biphasic dose-response induced by phytochemicals: experimental evidence. *Journal of Clinical Medicine*, 9(3), 718.
- Jørgensen, L.V., Cornett, C., Justesen, U., Skibsted, L.H., Dragsted, L.O. 1998. Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring. *Free Radical Research* 29, 339-350.
- Jungbluth, G., Ternes, W. 2000. HPLC separation of flavonols, flavones and oxidized flavonols with UV-DAD-, electrochemical and ESI-ion trap MS detection. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 367:7, 661-666.
- Jurasekova, Z., Domingo, C., Garcia-Ramos, J.V., Sanchez-Cortes, S. 2014. Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy. *Physical Chemistry* 16:25, 12802-12811.
- Krishnamachari, V., Levine, L. H., Paré, P. W. 2002. Flavonoid oxidation by the radical generator AIBN: a unified mechanism for quercetin radical scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(15), 4357-4363.
- Kessler, M., Ubeaud, G., Jung, L. 2003. Anti-and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 55(1), 131-142.
- Kim, G. N., y Jang, H. D. 2009. Protective Mechanism of Quercetin and Rutin Using Glutathione Metabolism on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Oxidative Stress in HepG2 Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171(1), 530-537.
- Kocábová, J., Fiedler, J., Degano, I., Sokolová, R. 2016. Oxidation mechanism of flavanone taxifolin. Electrochemical and spectroelectrochemical investigation. *Electrochimica Acta* 187, 358-363.

- Kubo, I., Kinst-Hori, I., Chaudhuri, S., Kubo, Y., Sanchez, Y., Ogura, T. 2000. Flavonols from heterotheca inuloides: Tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 8, 1749–1755.
- Kumar, S., Pandey, A. K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Kubo, I., Nihei, K. I., Shimizu, K. 2004. Oxidation products of quercetin catalyzed by mushroom tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12(20), 5343-5347.
- Lanas, A., Sopeña, F. 2009. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and lower gastrointestinal complications. *Gastroenterology Clinics* 38(2), 333-352.
- Laughton, M. J., Halliwell, B., Evans, P. J., Robin, J., Hoult, S. 1989. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin: effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochemical pharmacology*, 38(17), 2859-2865.
- Leri, M., Scuto, M., Ontario, M. L., Calabrese, V., Calabrese, E. J., Bucciantini, M., Stefani, M. 2020. Healthy effects of plant polyphenols: molecular mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 21(4), 1250.
- Li, X. Q., Wang, C., Yang, T., Fan, Z. K., & Guo, X. F. 2022. A meta-analysis of prospective cohort studies of flavonoid subclasses and stroke risk. *Phytotherapy Research* 36(3), 1103-1114.
- Little, D., Jones, S. L., Blikslager, A. T. 2007. Cyclooxygenase (COX) inhibitors and the intestine. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21(3), 367-377.
- Liu, X. M., Liu, Y. J., Huang, Y., Yu, H. J., Yuan, S., Tang, B. W., He, Q. Q. 2017. Dietary total flavonoids intake and risk of mortality from all causes and cardiovascular disease in the general population: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Molecular Nutrition & Food Research* 61(6), 1601003.

- Ly, T. N., Hazama, C., Shimoyamada, M., Ando, H., Kato, K., Yamauchi, R. 2005. Antioxidative compounds from the outer scales of onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(21), 8183-8189.
- Makris, D. P., Rossiter, J. T. 2002. An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols. *Food Chemistry* 77(2), 177-185.
- Maity, P., Bindu, S., Dey, S., Goyal, M., Alam, A., Pal, C., Bandyopadhyay, U. 2009. Indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, develops gastropathy by inducing reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathology and associated apoptosis in gastric mucosa: a novel role of mitochondrial aconitase oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 3058-3068.
- Mazumder, S., De, R., Debsharma, S., Bindu, S., Maity, P., Sarkar, S., Bandyopadhyay, U. 2019. Indomethacin impairs mitochondrial dynamics by activating the PKC $\zeta$ -p38-DRP1 pathway and inducing apoptosis in gastric cancer and normal mucosal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 294(20), 8238-8258.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A. K., Cenas, N., Dickançaitė, E., Segura-Aguilar, J. 1999. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biology and Medicine* 26(1-2), 107-116.
- Micek, A., Raźny, U., Paweł, K. 2021. Association between health risk factors and dietary flavonoid intake in cohort studies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 72(8), 1019-1034.
- Mladěnka, P., Zatloukalová, L., Filipský, T., Hrdina, R. 2010. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine* 49(6), 963-975.

- Moreno-Sánchez, R., Bravo, C., Vásquez, C., Ayala, G., Silveira, L. H., & Martínez-Lavín, M. 1999. Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: study in mitochondria, submitochondrial particles, cells, and whole heart. *Biochemical pharmacology*, 57(7), 743-752.
- Morgan, M. J., & Liu, Z. G. 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell research*, 21(1), 103-115.
- Morina, F., Takahama, U., Yamauchi, R., Hirota, S., Veljovic-Jovanovic, S. 2015. Quercetin 7-O-glucoside suppresses nitrite-induced formation of dinitrosocatechins and their quinones in catechin/nitrite systems under stomach simulating conditions. *Food & function*, 6(1), 218-228.
- Mozaffarian, D., Wu, J. H. 2018. Flavonoids, dairy foods, and cardiovascular and metabolic health: a review of emerging biologic pathways. *Circulation research* 122(2), 369-384.
- Oteiza, P. I., Fraga, C. G., Galleano, M. 2021. Linking biomarkers of oxidative stress and disease with flavonoid consumption: from experimental models to humans. *Redox Biology*, 42, 101914.
- Park, M. H., Hong, J. T. 2016. Roles of NF- $\kappa$ B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cells* 5(2), 15.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.
- Ramešová, S., Degano, I., Sokolová, R. 2014. Two oxidation pathways of bioactive flavonol rhamnazin under ambient conditions. *Electrochemical Acta* 133, 359-363.
- Ramešová, S., Sokolová, R., Degano, I. 2015. The study of the oxidation of the natural flavonol fisetin confirmed quercetin oxidation mechanism. *Electrochemical Acta* 182, 544-549.



Ramešová, S., Degano, I., Sokolová, R. 2017. The oxidative decomposition of natural bioactive compound rhamnetin. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 788, 125-130.

Ramos, F. A., Takaishi, Y., Shirotori, M., Kawaguchi, Y., Tsuchiya, K., Shibata, H., Takeuchi, M. 2006. Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(10), 3551-3557.

Sandoval-Acuña, C.; Lopez-Alarcón, C.; Aliaga, M. E.; Speisky, H. 2012. Inhibition of mitochondrial complex I by various non-steroidal anti-inflammatory drugs and its protection by quercetin via a coenzyme Q-like action. *Chemical-Biological Interactions* 2012, 199, 18–28.

Sehnert, B., Burkhardt, H., Dübel, S., & Voll, R. E. 2020. Cell-type targeted NF-kappaB inhibition for the treatment of inflammatory diseases. *Cells* 9(7), 1627.

Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. 2017. Oxidative stress. *Annual review of biochemistry* 86, 715-748.

Sies, H. 2020. Oxidative stress: concept and some practical aspects. *Antioxidants* 9, 852.

Sokolová, R., Ramešová, Š., Degano, I., Hromadová, M., Gál, M., Žabka, J. 2012. The oxidation of natural flavonoid quercetin. *Chemical Communications* 48(28), 3433-3435.

Sokolová, R., Ramešová, Š., Kocábová, J., Kolivoška, V., Degano, I., Pitzalis, E. 2016. On the difference in decomposition of taxifolin and luteolin vs. fisetin and quercetin in aqueous media. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* 147(8), 1375-1383.

Speisky, H.; Fuentes, J.; Dorta, E.; López-Alarcón, C. Chapter 1, Polyphenols: Sources and main characteristics. In *Advances in Technologies for Producing Food-Relevant Polyphenols*, 1st ed.; Cuevas-Valenzuela, J., Vergara-Salinas,

J.R., Pérez-Correa, J.R., Eds.; CRC Press Taylor & Francis: Abingdon, UK, 2016; pp. 1–32.

Speisky, H., Shahidi, F., Costa de Camargo, A., Fuentes, J. 2022. Revisiting the Oxidation of Flavonoids: Loss, Conservation or Enhancement of Their Antioxidant Properties. *Antioxidants* 11(1), 133.

Starkov, A. A., & Fiskum, G. 2003. Regulation of brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *Journal of neurochemistry*, 86(5), 1101-1107.

Suzuki, T. 2020. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal Science Journal*, 91(1), e13357.

Tanigawa, S., Fujii, M., Hou, D. X. 2007. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radical Biology and Medicine* 42(11), 1690-1703.

Tomita, T.; Sadakata, H.; Tamura, M.; Matsui, H. 2014. Indomethacin-induced generation of reactive oxygen species leads to epithelial cell injury before the formation of intestinal lesions in mice. *Journal of Physiological Pharmacology* 65, 435–440.

Van Acker, S., de Groot, M. J., van den Berg, D., Tromp, M., Donne'-Op den Kelder, G., van der Vijgh, W., & Bast, A. 1996. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chemical Research in Toxicology* 9, 1305–1312.

Vásquez-Espinal, A., Yañez, O., Osorio, E., Areche, C., García-Beltrán, O., Ruiz, L. M., Tiznado, W. 2019. Theoretical study of the antioxidant activity of quercetin oxidation products. *Frontiers in Chemistry* 7, 818.

Wang, X., Ouyang, Y. Y., Liu, J., Zhao, G. 2014. Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *British Journal of Nutrition* 111(1), 1-11.

Wen, Z., Liu, W., Li, X., Chen, W., Liu, Z., Wen, J., Liu, Z. 2019. A protective role of the NRF2-Keap1 pathway in maintaining intestinal barrier function. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019.

Wilms, L. C., Kleinjans, J. C., Moonen, E. J., Briedé, J. J. 2008. Discriminative protection against hydroxyl and superoxide anion radicals by quercetin in human leucocytes in vitro. *Toxicology in vitro*, 22(2), 301-307.

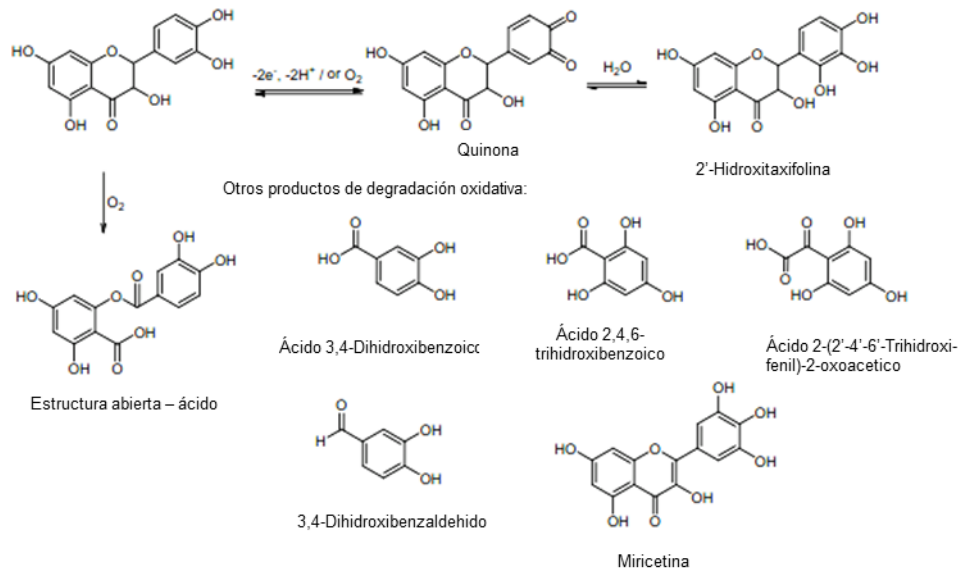
Yamamoto, Y., Yin, M. J., Lin, K. M., Gaynor, R. B. 1999. Sulindac inhibits activation of the NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Biological Chemistry* 274(38), 27307-27314.

Zenkevich, I. G., Eshchenko, A. Y., Makarova, S. V., Vitenberg, A. G., Dobryakov, Y. G., Utsal, V. A. 2007. Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature. *Molecules* 12(3), 654-672.

Zhou, A., Sadik, O. 2008. Comparative analysis of quercetin oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: A mechanistic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 12081–12091.

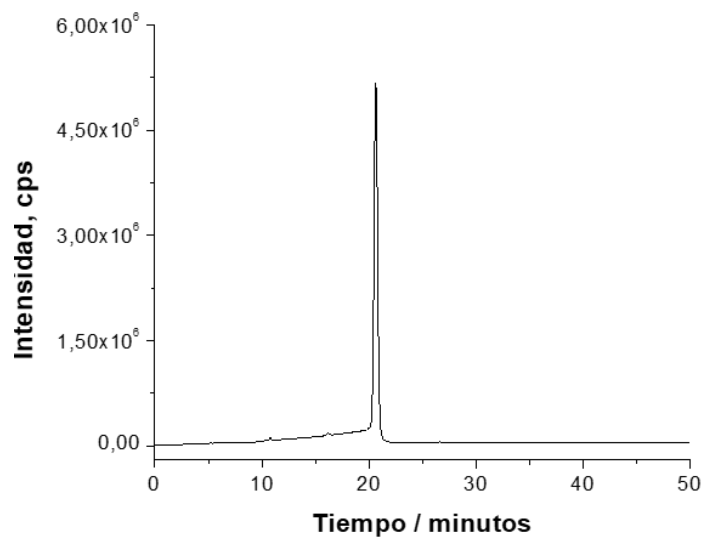
## 8. ANEXOS

### ANEXO I: Productos de degradación de taxifolina (Extraído de Sokolova *et al.*, 2016)

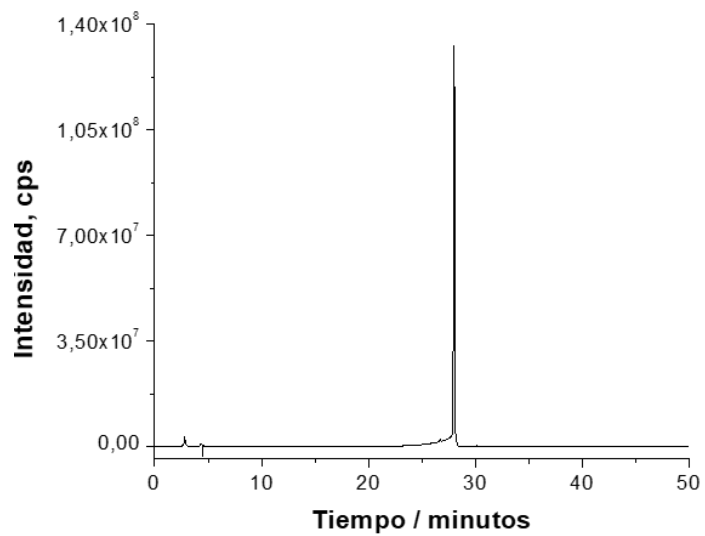


**ANEXO II:** Cromatogramas HPLC-ESI-MS/MS de las fracciones de BZF aisladas y de los tres peaks analizados en DDQox.

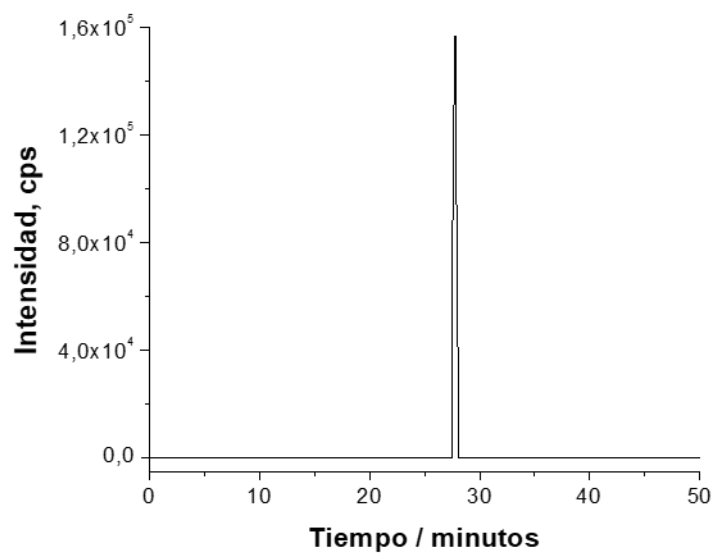
a) BZF aislada derivada de miricetina (MYR-BZF):  $t_R$  20,6 min



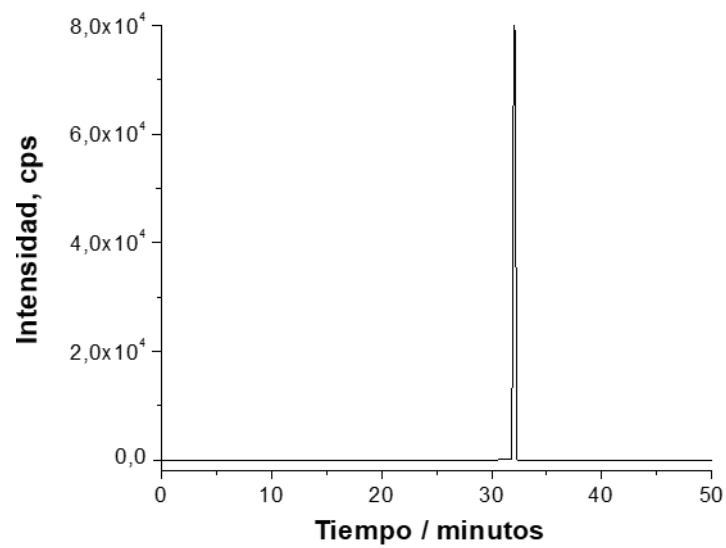
b) BZF aislada derivada de quercetina (Q-BZF):  $t_R$  27,8 min



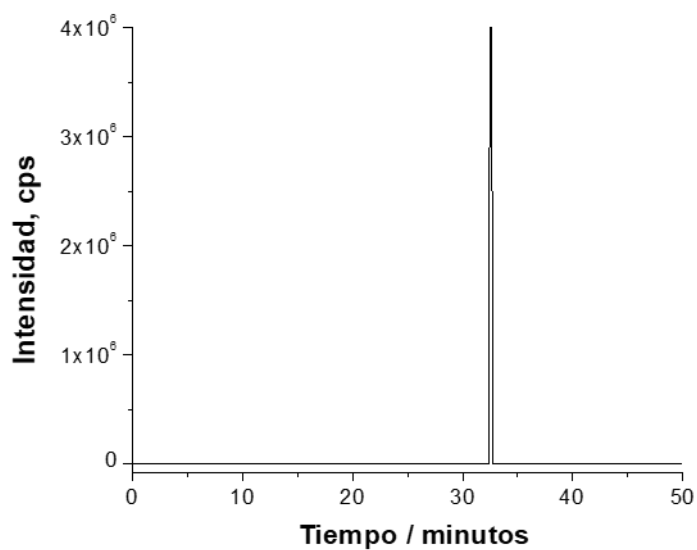
c) BZF aislada derivada de fisetina (FIS-BZF) :  $t_R$  27,9 min



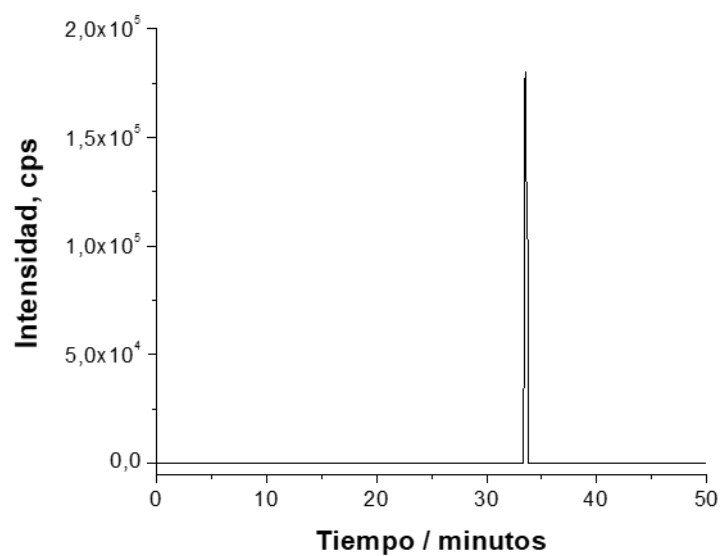
d) BZF aislada derivada de kaempferol (KAEM-BZF) :  $t_R$  31,9 min



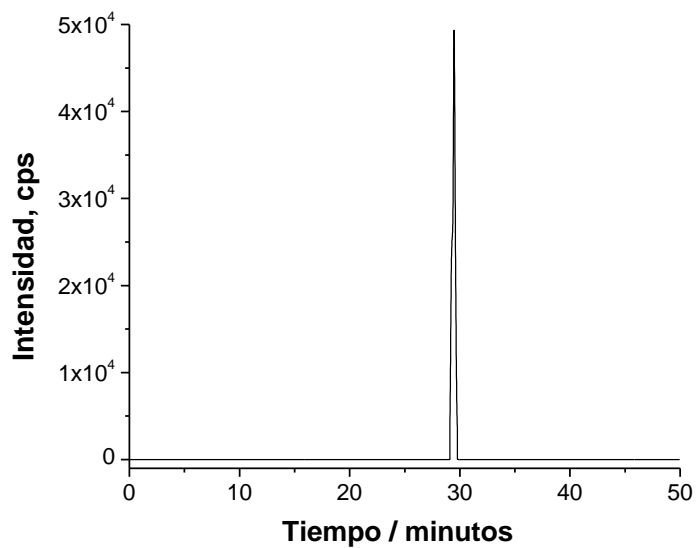
e) BZF aislada derivada de isoramnetina (ISO-BZF) :  $t_R$  32,5 min



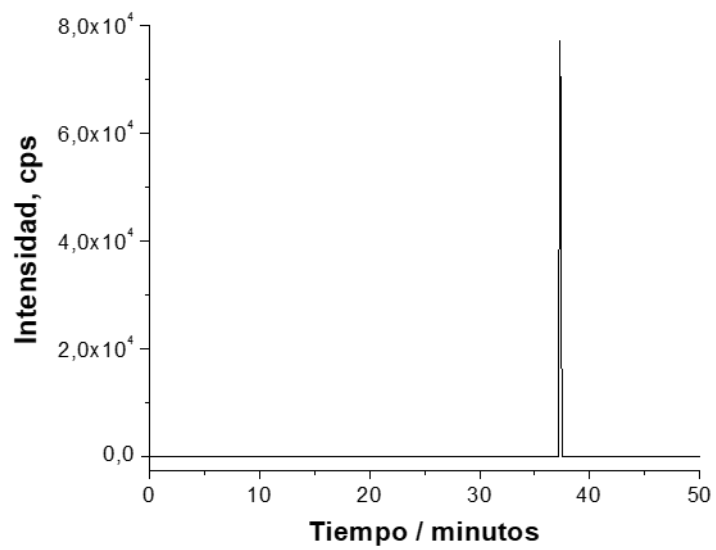
f) BZF aislada derivada de morina (MOR-BZF) :  $t_R$  33,5 min



g) Fracción aislada desde DDQox correspondiente al  $t_R$  29,3 min

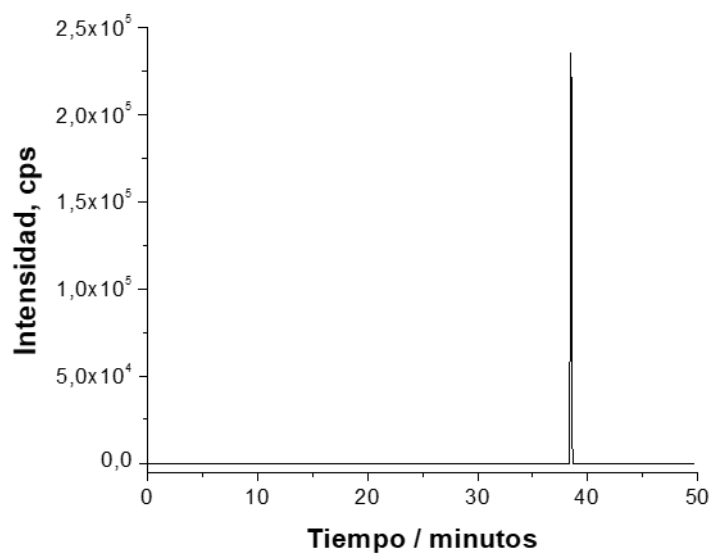


h) Fracción aislada desde DDQox correspondiente al  $t_R$  37,1 min

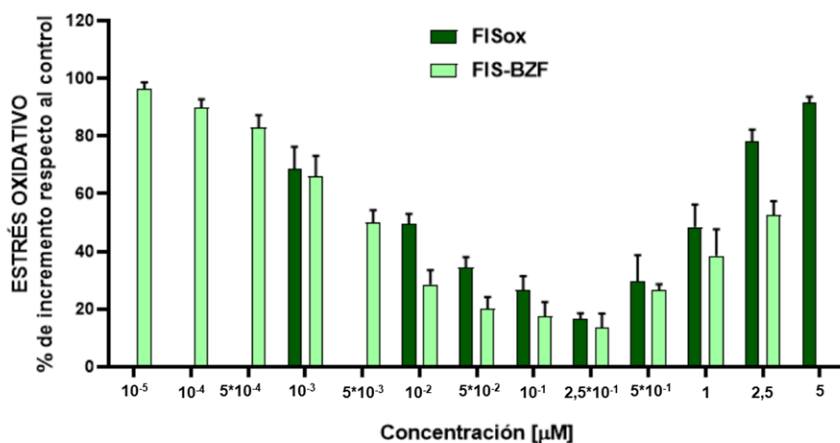
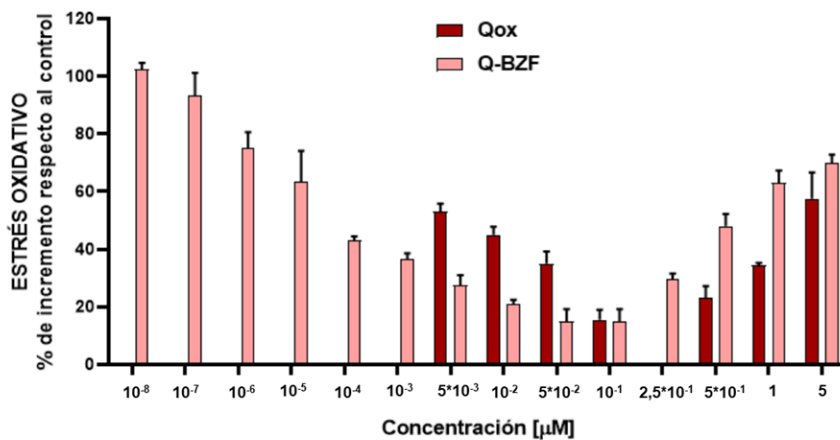
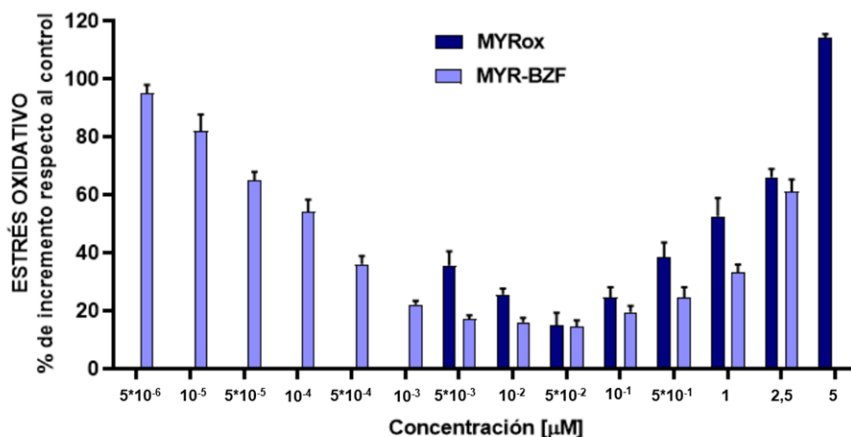


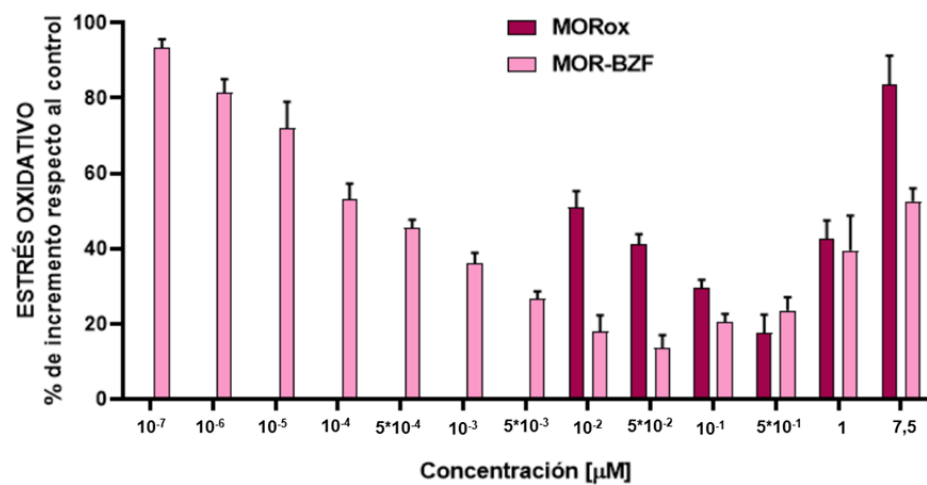
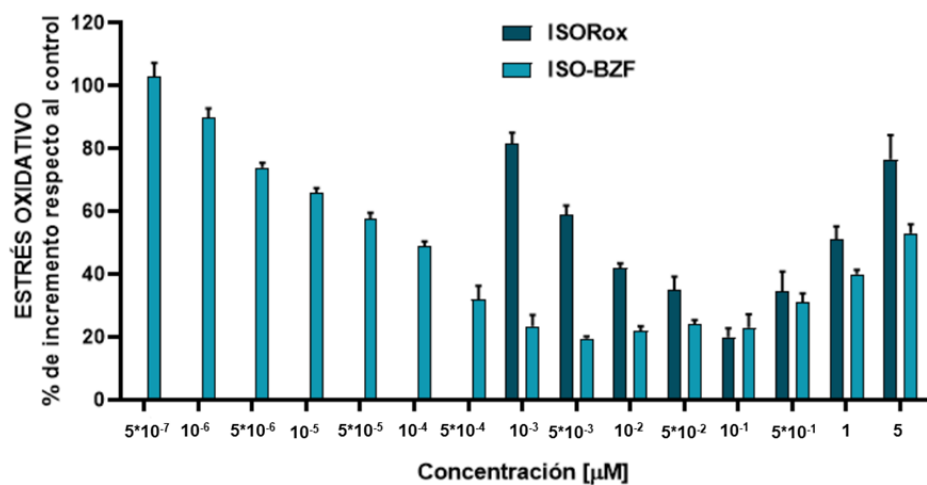
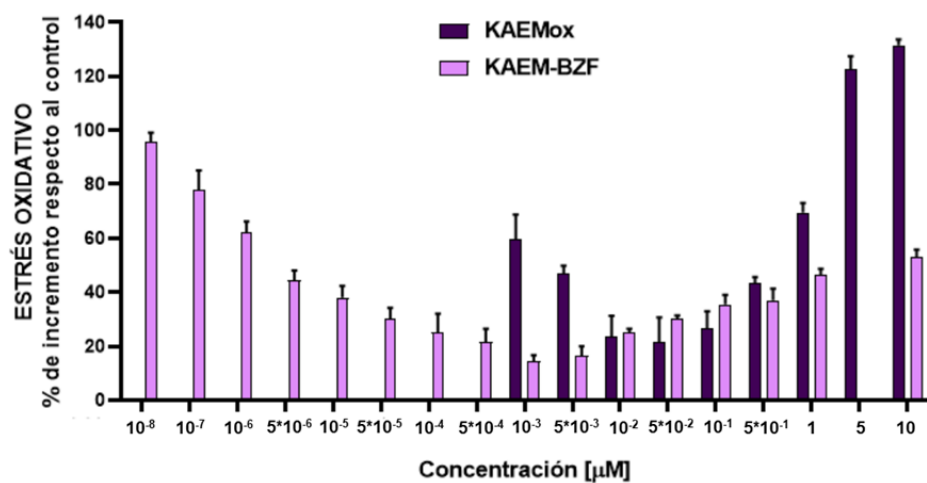


i) Fracción aislada desde DDQox correspondiente al  $t_R$  38,4 min

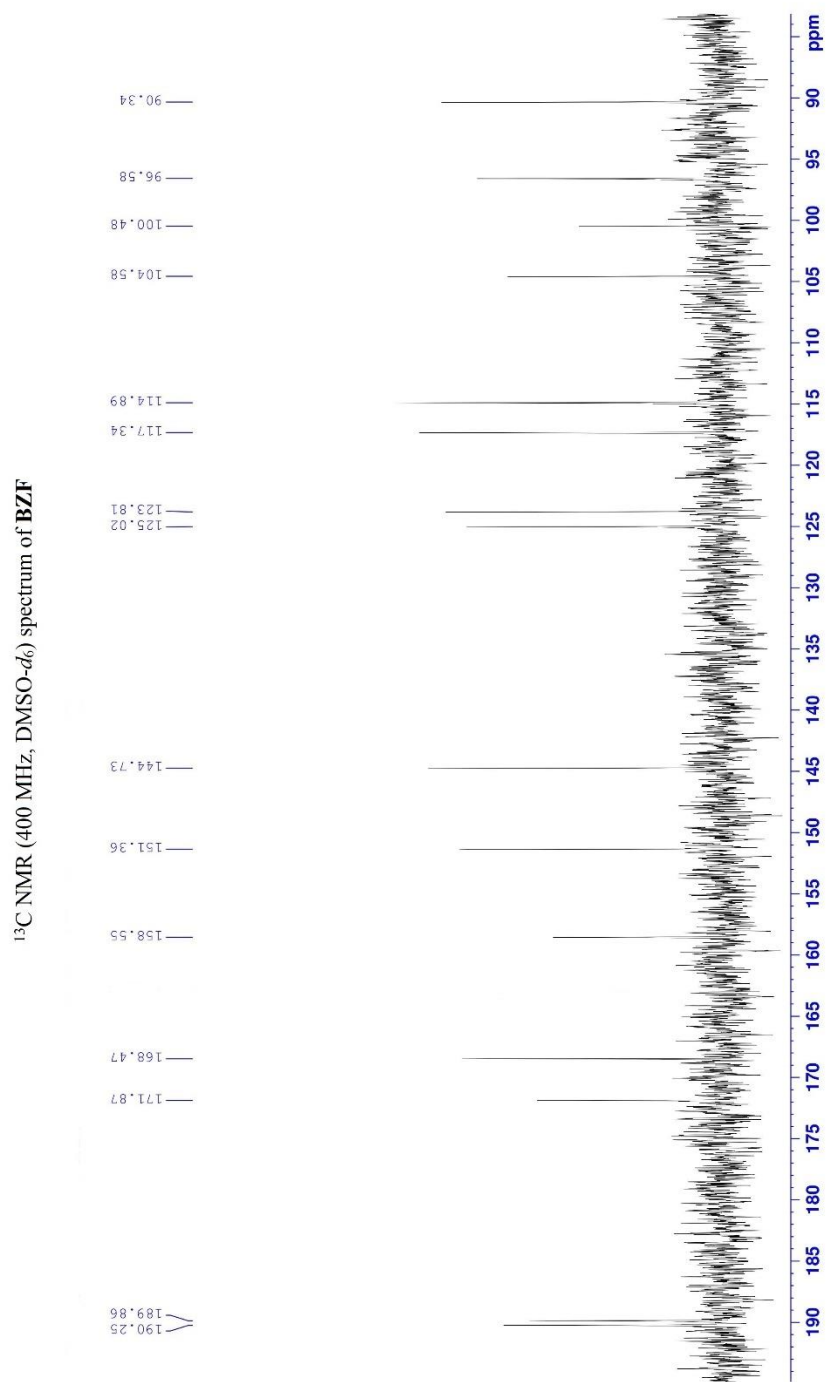


**ANEXO III. Comparación de efectos antioxidantes de FLox versus BZF aisladas.** Para las BZF de quercetina (Q-BZF) y kaempferol (KAEM-BZF) se expresan sus concentraciones reales, para las otras 4 BZF se presentan sus concentraciones equivalentes.





## ANEXO IV. Espectros RMN de Q-BZF aislada



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) spectrum of **BZF**.

