

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 COMPORTAMENT CROMATOGRÀFIC DE LES BARREGES DE DESPOLIMERITZACIÓ DE PROCIANIDINES EN PRESENCIA DE TIOLS. ESCALA ANALÍTICA

La despolimerització es va portar a terme tal com es descriu a l'apartat 3.3.2.1.1 per tractament àcid en presència del tiol corresponent. Amb l'objectiu de trobar les condicions òptimes per a separar i purificar els flavanols derivats de la resta del cru, les barreges de despolimerització obtingudes amb L-cisteamina (CYA) i L-cisteïna (CYS) a partir de la fracció OW es van sotmetre a cromatografia en fase reversa i bescanvi catiònic a escala analítica. Aquests resultats serviren després com a guia per a les barreges de despolimerització obtingudes amb l'èster etílic d'hidroclorur de L-cisteïna (OET) i amb la *N*-acetil-L-cisteïna (NAC).

4.1.1 Cromatografia d'alta eficàcia en fase reversa

Es van emprar columnes Vydac C18 i μ RPC en els seus corresponents sistemes, tal com es descriu a 3.3.5.1, a tres longituds d'ona: 214 nm, 280 nm i 320 nm. A 214 nm absorbeixen enllaços dobles i triples, tiols i carbonils, pel que es detecten tots els compostos fenòlics a més d'altres espècies com ara els pèptids i les proteïnes. A 280 nm absorbeixen els compostos que contenen anells aromàtics, entre ells els compostos fenòlics. A 320 nm es detecten els sistemes amb major grau de conjugació com les cumarines, els èsters hidroxicinnàmics i els flavanols que contenen el grup galat.

S'emprà l'elució amb gradient per tal de monitoritzar el procés de despolimerització, a més de comparar els cromatogrames de les mostres tractades amb CYS i amb CYA. En la comparació es van observar pics que no variaven el seu temps d'elució en ambdues mostres, corresponents als monòmers de (-)-epicatequina (**1**) i (+)-catequina (**2**) (per a la numeració dels diferents compostos veure Annex I.1). La retenció depèn de la hidrofobicitat de les molècules, sent el compost que conté l'èster gal·lat (**3**) el més retingut. Amb els conjugats s'observà que els derivats de cisteïna (**7-9**) (Figura 14c), degut a la polaritat del grup carboxílic, s'elueixen lleugerament abans que els derivats de cisteamina (**4-6**) (Figura 14b i Annex II.1 (Torres, 2001) i II.2 (Lozano *et al.*, 2002)).

L'elució en condicions isocràtiques, per altra banda, permet fer una anàlisi ràpida i continua de diverses alíquotes d'una mateixa mostra. Aquesta s'emprà, preferentment, per a

determinar el contingut de les fraccions obtingudes en els processos a escala mil·ligram i gram, descrits en els apartats corresponents a la purificació.

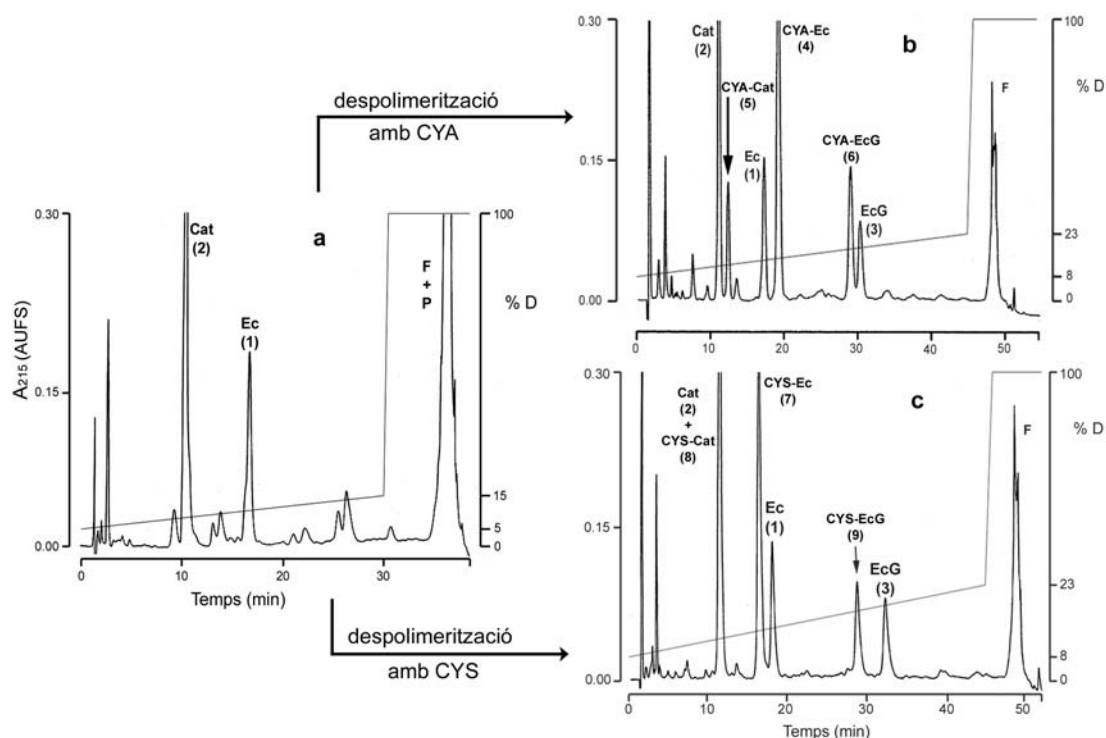


Figura 14. Perfils de cromatografia en fase reversa on es mostra la despolimerització en medi àcid. (a) Fracció OW, (b) OW després d'un tractament amb cisteamina (OW-CYA) i (c) OW després d'un tractament amb cisteïna (OW-CYS), tal com es descriu a l'apartat 3.3.2.1.1. Columna, μ RPC C2/C18 SC 2,1/10, 120 Å, 3 μ m, 100x2,1 mm. Càrrega, 4 μ L (~1 μ g productes derivats). L'elució es feu tal com es descriu a l'apartat 3.3.5.1 amb el gradient de 8% a 23% de [D'] en 45 min, excepte en el cromatograma a, que fou de 5% a 15% de [D'] en 30 min amb càrrega 20 μ L (~3 μ g de cru). Flux 200 μ L/min. F: flavonols, P: procianidines polimèriques.

4.1.2 Condicions d'elució per bescanvi catiònic dels derivats de cisteïna i cisteamina

Amb l'objectiu de separar i purificar els conjugats de la resta del cru es va pensar en aprofitar la càrrega positiva del grup amino, introduït al derivatitzar-los, per a retenir-los per bescanvi catiònic. És ben conegut que els polímers que formen part de les fases estacionàries de bescanvi catiònic retenen bioproductes, com els pèptids, mitjançant interaccions hidrofòbiques (Burke *et al.*, 1989). Un mètode ja establert per a eliminar aquestes interaccions és l'addició d'una fase mòbil amb un co-solvent orgànic miscible en aigua, generalment 10-20% de CH₃CN. Tot i així, es va pensar en buscar solvents alternatius que fossin menys tòxics i/o més econòmics. Es feu un estudi previ, a escala de micrograms, amb diversos co-solvents alternatius per a determinar quin seria l'òptim.

Les fraccions a estudi es van obtenir tal i com es descriu en l'apartat 3.3.2.1.1 i l'estudi es va fer seguint les condicions de bescanvi iònic descrites a l'apartat 3.3.3.1.

Es van escollir dos co-solvents donadors-receptors de ponts d'hidrogen (MeOH, EtOH), un donador de ponts d'hidrogen (THF) i un de caràcter dipolar fort (CH₃CN), amb els quals es podia abastar un ampli ventall de condicions.

El rang de treball dels solvents va ser de: 10%-80% per a EtOH, 10%-85% per a MeOH, 10%-50% per a THF i 10%-70% per a CH₃CN. A elevada proporció de co-solvent, es va haver de reduir la concentració de sal en l'eluent [B] per evitar la formació de dos fases. Apart, el THF presentà problemes de compatibilitat amb les bombes de xeringa del sistema d'HPLC analític, per la qual cosa només es disposà de dades a un dels valors de pH (4,75).

Es treballà a dos valors de pH. A pH 4,75 els 2-aminoetil tio derivats (obtinguts amb cisteamina) **4-6** presentaren una càrrega neta positiva, permetent la retenció a la columna per interacció electrostàtica, mentre que els S-cisteinil derivats **7-9** no foren retinguts, probablement perquè a aquest pH la població de grups carboxil només estava parcialment protonada i la càrrega neta de la molècula era neutre. En canvi, a pH 2,26 **7-9** estaven completament protonats, per la qual cosa mostraren unes propietats cromatogràfiques més semblants als derivats de cisteamina que permeteren la seva separació de la resta del cru. El resultat d'aquest estudi es reflecteix en les Taules 3-9, on es resumeixen, per a cada condició d'elució, els paràmetres cromatogràfics següents:

- El factor de retenció (R_x), mesura que la retenció d'un compost no sigui confosa amb la capacitat de càrrega de la columna.

$$R_x = \frac{V_x - V_0}{V_0}$$

- La selectivitat (α), defineix la capacitat del sistema per separar els pics.

$$\alpha = \frac{V_b}{V_a}$$

- La resolució (R_s), que mesura la separació relativa entre dos pics. Una bona resolució entre dos pics s'aconsegueix amb $R_s \geq 1,5$.

$$R_s = \frac{V_b - V_a}{(W_a - W_b)/2}$$

$V_{a,b,x}$, volum d'elució dels diferents pics; V_0 , volum mort, que en aquest sistema és 0,1 mL; $W_{a,b}$, amplada del pic a la base.

Taula 3. Comportament cromatogràfic en bescanvi catiònic de les barreges de despolimerització eluïdes amb tampò fosfat sòdic pH 2,26 i EtOH com a co-solvent. Càrrega 20 μ L (~ 2 μ g polifenols) en una columna Mono S PC 1,6/5; 3 μ m; 50 \times 1,6mm. Condicions d'elució descrites a l'apartat 3.3.3.1.

Co-solvent	%	Mostra	Va (mL)	Vb (mL)	Ra	Rb	Wa	Wb	α	Rs
EtOH pH 2,26	10	OW-CYS	2,8	n.e.	27,0	--	--	--	--	--
		OW-CYA	2,5	n.e.	24,1	--	0,3	--	--	--
	20	OW-CYS	2,0	2,7	18,8	25,6	0,3	0,4	1,3	7,2
		OW-CYA	1,7	3,0	16,0	29,4	0,1	0,4	1,8	9,6
	30	OW-CYS	1,1	1,1	10,0	10,0	0,1	0,1	1,0	0,0
		OW-CYA	1,3	1,6	12,4	14,6	0,1	0,1	1,2	11,0
	40	OW-CYS	n.r.	n.r.	5,6	5,6	--	--	--	--
		OW-CYA	1,1	1,1	9,9	9,9	0,1	0,1	1,0	0,0
	50	OW-CYA	0,9	0,9	8,5	8,0	0,1	0,2	0,9	1,1
	60	OW-CYA	0,7	0,6	5,7	5,3	0,2	0,2	0,9	4,0

On, a: és el pic que conté els derivats de epicatequina (4 ó 7) i de catequina (5 ó 8).

b: és el pic que conté el derivat de epicatequin 3-O-galat (6 ó 9).

OW-CYS: és el resultat de despolimeritzar amb cisteïna.

OW-CYA: és el resultat de despolimeritzar amb cisteamina.

n.r.: No retingut.

n.e.: No eluït.

Aquesta nomenclatura és vàlida en les restants Taules. Es realitzà una única càrrega per condició. Posteriorment, es feu un estudi de reproduïbilitat en un mateix dia (5 càrregues idèntiques) i en dies consecutius (4 dies) en condicions de retenció hidrofòbica (25% d'EtOH) i hidrofílica (50% EtOH). Les mesures tingueren una desviació estàndard màxima de \pm 5% respecte el valor mig dels 5 experiments consecutius, i de \pm 8% entre les quatre mitjanes dels dies consecutius.

Taula 4. Comportament cromatogràfic en bescanvi catiònic de les barreges de despolimerització eluïdes amb tampò fosfat sòdic pH 2,26 i MeOH com a co-solvent. Càrrega 20 μ L (~ 2 μ g polifenols) en una columna Mono S PC 1,6/5; 3 μ m; 50 \times 1,6mm. Condicions d'elució descrites a l'apartat 3.3.3.1.

Co-solvent	%	Mostra	Va (mL)	Vb (mL)	Ra	Rb	Wa	Wb	α	Rs
MeOH pH 2,26	10	OW-CYS	2,2	n.e.	21,1	--	0,3	--	--	--
		OW-CYA	3,3	n.e.	32,5	--	0,4	--	--	--
	20	OW-CYS	1,5	2,5	14,3	23,8	0,2	1,3	1,6	1,7
		OW-CYA	2,2	--	21,3	--	0,3	--	--	--
	30	OW-CYS	1,1	2,0	10,5	19,1	0,1	0,4	1,7	5,1
		OW-CYA	1,6	3,0	15,4	29,4	0,1	0,4	1,8	10,4
	40	OW-CYS	0,9	1,4	8,3	12,6	0,2	0,2	1,5	0,0
		OW-CYA	1,4	1,9	12,6	17,9	0,1	0,2	1,4	9,6
	50	OW-CYS	n.r.	n.r.	6,2	6,2	0,4	0,4	1,0	0,0
		OW-CYA	1,2	1,2	10,7	10,7	0,1	0,1	1,0	0,0
	60	OW-CYA	1,1	1,0	9,4	9,4	0,1	0,1	0,9	14,0

Taula 5. Comportament cromatogràfic en bescanvi catiònic de les barreges de despolimerització eluïdes amb tampò fosfat sòdic pH 2,26 i CH₃CN com a co-solvent. Càrrega 20 μ L (~ 2 μ g polifenols) en una columna Mono S PC 1,6/5; 3 μ m; 50 \times 1,6mm. Condicions d'elució descrites a l'apartat 3.3.3.1.

Co-solvent	%	Mostra	Va (mL)	Vb (mL)	Ra	Rb	Wa	Wb	α	Rs
CH ₃ CN pH 2,26	10	OW-CYS	1,5	3,3	13,8	31,7	0,1	0,5	2,2	9,9
		OW-CYA	2,1	n.e.	20,0	--	0,2	--	--	--
	20	OW-CYS	1,1	1,4	9,6	12,8	0,1	0,2	1,3	5,3
		OW-CYA	1,4	1,9	13,4	17,8	0,1	0,2	1,3	29,3
	30	OW-CYS	n.r.	n.r.	--	--	--	--	--	--
		OW-CYA	1,1	1,1	9,7	10,4	0,1	0,1	1,1	14
	40	OW-CYA	n.r.	n.r.	--	--	--	--	--	--

Taula 6. Comportament cromatogràfic en bescanvi catiònic de les barreges de despolimerització eluïdes amb tampò acetat sòdic pH 4,75 i EtOH com a co-solvent. Càrrega, 20 μ L (~ 2 μ g polifenols) en una columna Mono S PC 1,6/5; 3 μ m; 50 \times 1,6mm. Condicions d'elució descrites a l'apartat 3.3.3.1.

Co-solvent	%	Mostra	Va (mL)	Vb (mL)	Ra	Rb	Wa	Wb	α	Rs
EtOH pH 4,75	10	OW-CYS	2,4	n.e	23,4	--	0,8	--	--	--
		OW-CYA	2,5	n.e	24,0	--	0,3	--	--	--
	20	OW-CYS	1,5	1,8	13,8	17,0	0,6	0,2	1,2	0,8
		OW-CYA	1,7	3,0	16,4	29,1	0,1	0,4	1,7	4,7
	30	OW-CYS	1,3	1,4	12,0	12,6	0,1	0,1	1,0	0,7
	40	OW-CYA	1,0	1,0	9,5		0,1	--	1,0	0,0
	50	OW-CYS	0,9	0,8	7,7	7,4	0,1	0,1	0,9	"-1"
	60	OW-CYA	0,8	0,8	7,3	6,8	0,1	0,2	0,9	0,0
	70, 80	OW-CYA	n.r	n.r	--	--	--	--	--	--

Taula 7. Comportament cromatogràfic en bescanvi catiònic de les barreges de despolimerització eluïdes amb tampò acetat sòdic pH 4,75 i MeOH com a co-solvent. Càrrega, 20 μ L (~ 2 μ g polifenols) en una columna Mono S PC 1,6/5; 3 μ m; 50 \times 1,6mm. Condicions d'elució descrites a l'apartat 3.3.3.1.

Co-solvent	%	Mostra	Va (mL)	Vb (mL)	Ra	Rb	Wa	Wb	α	Rs
MeOH pH 4,75	10	OW-CYS	n.r.	n.r.	--	--	--	--	--	--
		OW-CYA	3,4	n.e.	33,3	--	0,5	--	--	--
	20	OW-CYA	2,3	n.e	22,3	--	0,3	--	--	--
	30	OW-CYA	1,7	3,2	15,8	31,0	0,1	0,5	1,9	4,9
	40	OW-CYA	1,4	1,9	13,0	18,0	0,1	0,2	1,4	3,1
	50	OW-CYA	1,2	1,3	10,7	12,4	0,1	0,1	1,1	2,3
	60	OW-CYA	1,0	1,2	9,4	10,7	0,1	0,1	1,1	1,0
	65, 75, 85	OW-CYA	n.r.	n.r.	--	--	--	--	--	--

Taula 8. Comportament cromatogràfic en bescanvi catiònic de les barreges de despolimerització eluïdes amb tampò acetat sòdic pH 4,75 i CH₃CN com a co-solvent. Càrrega, 20µL (~ 2µg polifenols) en una columna Mono S PC 1,6/5; 3µm; 50×1,6mm. Condicions d'elució descrites a l'apartat 3.3.3.1.

Co-solvent	%	Mostra	Va (mL)	Vb (mL)	Ra	Rb	Wa	Wb	α	Rs
CH ₃ CN pH 4,75	10	OW-CYS	n.r.	1,1	--	9,7	--	0,1	--	--
		OW-CYA	1,6	2,2	14,6	20,6	0,1	0,2	1,4	4,1
	20	OW-CYA	1,4	1,8	13,0	17,1	0,1	0,2	1,3	3,3
	30	OW-CYA	1,1	1,2	10,5	11,4	0,1	0,1	1,1	1,3
	40	OW-CYA	1,0	1,0	8,7	8,7	0,1	0,1	1,0	0,0
	50	OW-CYA	0,8	0,8	7,3	7,3	0,1	0,1	1,0	0,0
	60, 70	OW-CYA	0,6	0,5	--	--	--	--	--	--

Taula 9. Comportament cromatogràfic en bescanvi catiònic de les barreges de despolimerització eluïdes amb tampò acetat sòdic pH 4,75 i THF com a co-solvent. Càrrega, 20µL (~ 2µg polifenols) en una columna Mono S PC 1,6/5; 3µm; 50×1,6mm. Condicions d'elució descrites a l'apartat 3.3.3.1.

Co-solvent	%	Mostra	Va (mL)	Vb (mL)	Ra	Rb	Wa	Wb	α	Rs
THF pH 4,75	10	OW-CYA	1,9	n.e.	18,2	--	0,2	--	--	--
	15	OW-CYA	1,4	1,4	13,0	13,0	0,1	0,1	1,0	0,0
	20	OW-CYA	1,2	1,2	10,9	10,9	0,1	0,1	1,0	0,0
	25, 30, 40	OW-CYA	0,9	0,9	7,9	7,9	0,1	0,1	1,0	0,0

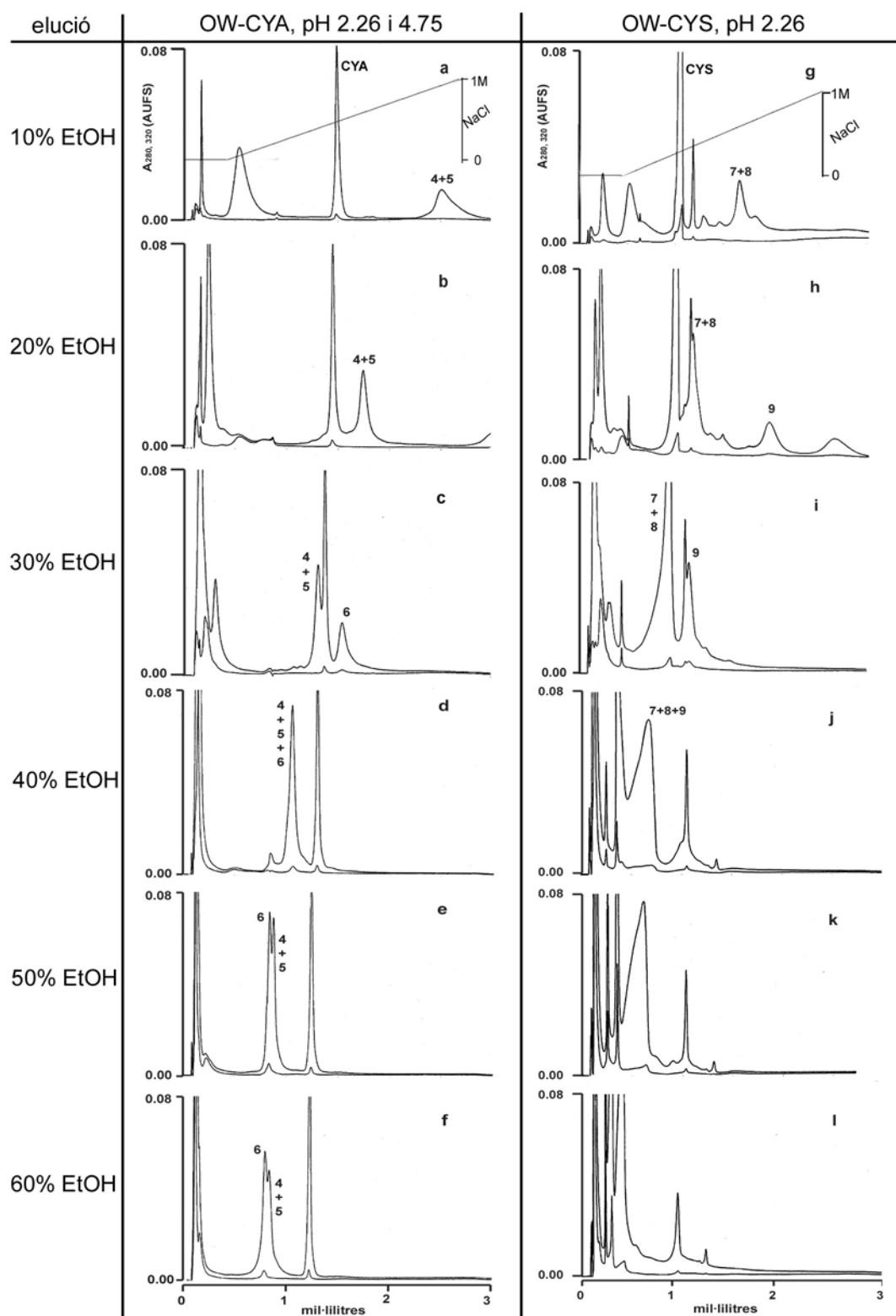


Figura 15. Cromatogrames d'elució dels cruds de despolimerització en cromatografia analítica de bescanvi catiónic en presència d'EtOH. Columna, Mono S PC 1,6/5; 3 μ m; 50x1,6 mm. Càrrega, 20 μ L (~2,5 μ g). Elució descrita a 3.3.3.1. Flux 100 μ L/min. Els senyals de CYS i CYA corresponen al reactiu en excés. De les dues corbes d'absorbància, la superior correspon a 280 nm i l'inferior a 320 nm.

La diferent retenció dels derivats a la reïna depèn de la participació de quatre factors:

- La interacció hidrofòbica entre la molècula i el suport de la reïna.
- La interacció electrostàtica entre els grups amino dels productes i els grups SO_3^- de la reïna.
- L'impediment estèric degut al volum de les molècules.
- La interacció hidrofílica entre el suport de la reïna i la molècula.

En la cromatografia, el factor electrostàtic és qui més contribuï en el temps de retenció. Això s'ha comprovat amb els derivats de cisteïna, que mostraren un notable augment de retenció al presentar una càrrega neta positiva a pH 2,26 (veure Taules 3-9). Però, tot i presentant la mateixa càrrega, els derivats no van co-eluir, sinó que l'ordre d'elució va ser de **5, 8 < 4, 7 << 6, 9** (Figura 15 b i c), sent l'últim el de major retenció i seguint així el mateix patró que en la cromatografia de fase reversa (Figura 14 b i c). Així, el factor que també aportà una notable contribució en l'ordre d'elució fou l'hidrofòbic, essent els derivats de l'(-)-epicatequin 3-O-galat els més retinguts degut a que presentaren un anell benzènic extra provinent del grup gal·loil.

Tal com s'ha comentat, les interaccions hidrofòbiques s'eliminen amb l'addició d'un co-solvent orgànic (Burke *et al.*, 1989). En el present cas, no tan sols s'ha intentat eliminar les interaccions hidrofòbiques, sinó que s'ha estudiat la possibilitat de separar derivats amb la mateixa càrrega mitjançant les interaccions amb la reïna. Així, en anar augmentant progressivament la proporció de dissolvent en els eluents s'observaren tres fenòmens:

Primer, la presència del dissolvent debilità les interaccions hidrofòbiques, provocant una disminució en la retenció i una dependència d'aquesta cada cop més important en l'atracció electrostàtica. Aquesta última atracció s'alliberà per un augment de la força iònica, com es fa normalment en bescanvi iònic fort. En les condicions d'eliminació de l'atracció hidrofòbica amb la reïna, els productes que presentaven la mateixa càrrega co-eluïren (Figura 15 d, j).

El segon efecte s'observà quan les interaccions hidrofòbiques havien estat eliminades (Figura 15 e, f). Si la reïna fora prou hidrofílica (com en aquest cas la Mono S) les interaccions dominants serien hidrofíliques i l'ordre d'elució canviaria. Així, els productes que contenien

el grup gal-loil van ser en aquestes condicions els que eluïren abans degut a que eren els més hidrofòbics. Aquest efecte s'ha anomenat cromatografia d'interacció hidrofílica/bescanvi catiònic, i ha estat descrita per biomolècules del tipus peptídic (Litowski *et al.*, 1999; Mant *et al.*, 1998).

L'últim efecte es produeix en seguir augmentant la proporció del co-solvent orgànic, observant-se un eixamplament dels pics al mateix temps que els productes eluïren sense necessitat de clorur sòdic (NaCl) ja que té suficient amb la sal present en el tampó per ser eluïts (Lozano *et al.*, 2002) (Annex II.2). Aquests últims fets s'associaren a un equilibri entre la retenció electrostàtica i la formació de parells iònics, estabilitzats per l'alta proporció de co-solvent (veure Figura 15 i, j, k i Figura 16). Aquest efecte ha estat descrit pel cas de la purificació de tensoactius catiònics biocompatibles (Torres *et al.*, 2001).

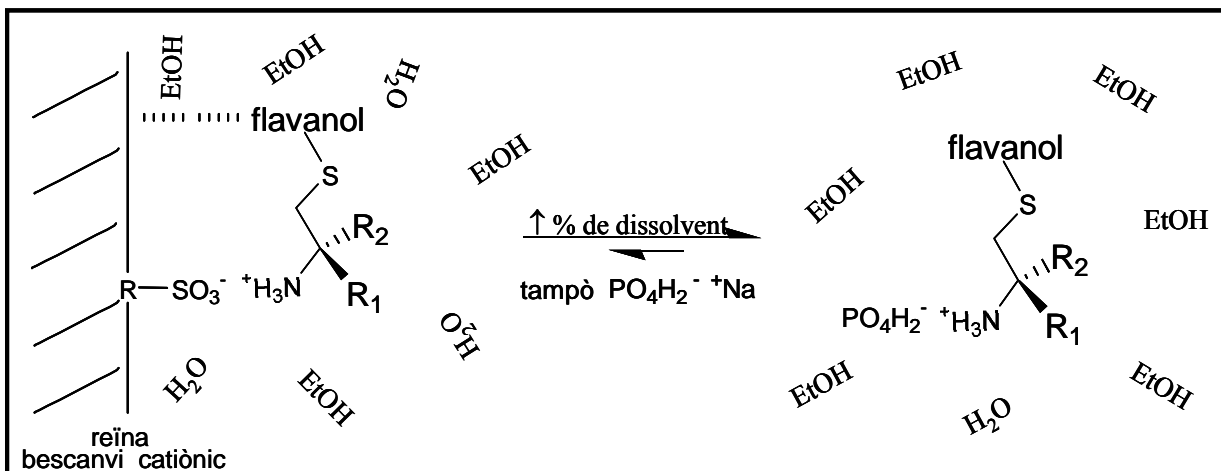


Figura 16. Model de modificació de l'equilibri generat al augmentar el co-solvent, afavorint una estabilització de parells iònics contraria a l'interacció amb la reïna. R₁= R₂= H pel cas de la cisteïna o R₁= COOH, R₂= H per la cisteïna.

4.1.3 Separació per bescanvi iònic entre els productes derivats i la resta del cru

S'aprofità l'estudi anterior per a escollir unes condicions d'elució que debilitessin les interaccions hidrofòbiques de tal manera que la retenció a la reïna depengués únicament de l'efecte electrostàtic. Això permetria separar quantitativament els monòmers derivats de la resta del cru amb un volum d'elució mínim. En el cas dels monòmers derivats amb cisteamina (4-6) i cisteïna (7-9), la seva càrrega neta positiva en la molècula permet l'interacció electrostàtica en la reïna de bescanvi catiònic.

L'etanol, degut als seus resultats de separació i elució obtinguts en l'apartat anterior, al seu preu i al seu baix nivell de toxicitat, fou l'eluent escollit. S'estudiaren, amb les condicions descrites a l'apartat 3.3.3.1, diverses condicions isocràtiques amb una proporció de solvent entre el 20% i el 40%.

Es va escollir la utilització de 30% d'EtOH en tampó fosfat sòdic pH 2,26 (Taula 3, Figura 15) per una separació eficient. Amb menys co-solvent els derivats que contenen el grup gàl·lic (6, 9) quedaven massa retinguts, mentre que proporcions majors de co-solvent comportaren, sobretot en el cas dels derivats de cisteïna, una pèrdua de retenció dels derivats.

La separació per bescanvi es va portar a terme en la columna Mono S, amb un flux de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Un cop va ser equilibrada amb [A], 20 mM de tampó fosfat sòdic, pH 2,25/EtOH (7:3), s'addicionà la barreja despolimeritzada amb CYA (OW-CYA, Figura 17 a) ó CYS (OW-CYS, Figura 17 d) diluïda 1/4 amb 0,1%TFA. Després de la càrrega, es van fer passar 10 volums de columna (1 mL) més de [A] per tal d'eluir tots aquells productes que no presentaven càrrega. Seguidament es van passar 10 volums de columna de [B], 20 mM de tampó fosfat sòdic, pH 2,25/EtOH (3:2), 1 M NaCl aconseguint alliberar els productes derivats retinguts.

Totes dues fraccions eluïdes s'obtingueren amb un volum ~ 1 mL. El solvent fou evaporat i els residus redissolts en 0.1%TFA i analitzats per RP-HPLC amb una columna Vydac C18 (Figura 17). D'aquesta manera es facilità la separació entre les unitats terminals del polímer (1-3) i les unitats d'extensió (4-6 i 7-9).

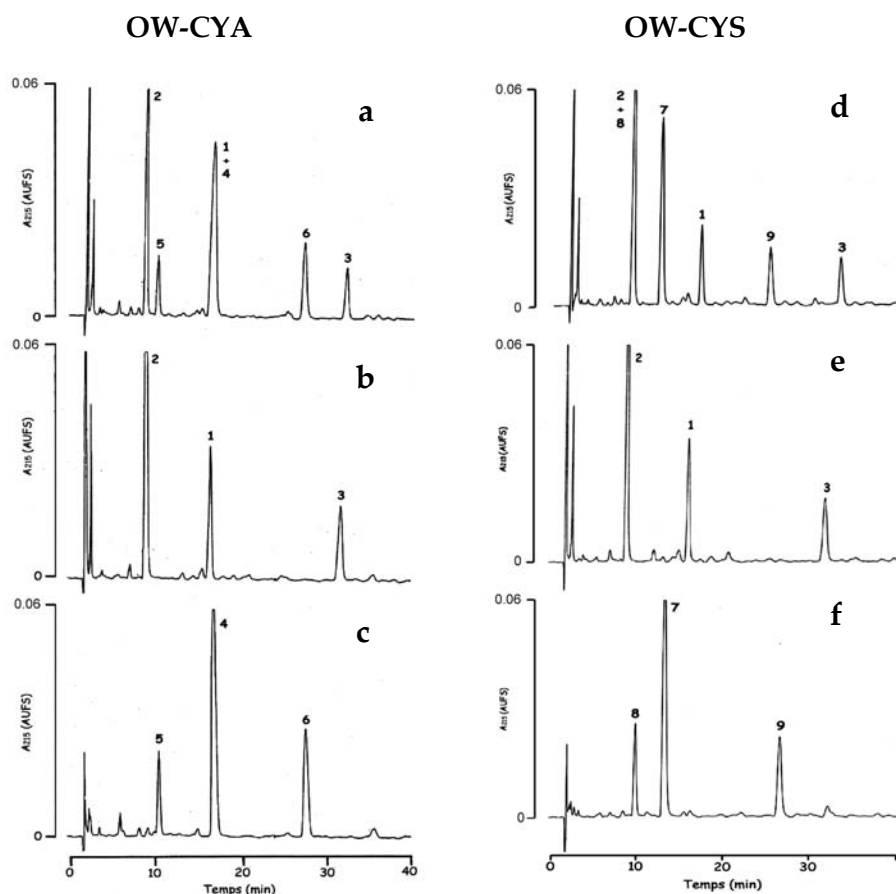


Figura 17. Perfils cromatogràfics de les barreges de despolimerització. (a, d) crus despolimeritzats. (b, e) productes no retinguts per bescanvi catiònic. (c, f) Productes retinguts per a bescanvi catiònic, eluïts amb 1 M de NaCl. Columna Vydac C18 300Å, 5 µm, 250×4,6 mm. Càrrega a i d, 15 µL (~22 µg de polifenols). Càrrega b, c, d i f 30 µL (~10 µg polifenols). Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Gradient de 8% a 23% [D'] en 45 min. Flux 1,5 mL/min.

Així, apart de la seva aplicació per a la preparació de derivats de flavanols, la derivatització amb cisteamina i anàlisi de la barreja per RP-HPLC (Figura 14 b) o la combinació de bescanvi catiònic i RP-HPLC descrita en aquest apartat (Figura 17 a-c), han estat proposats com a alternativa a la tiòlisi amb tiol- α -toluè per l'estimació del grau de polimerització de procianidines (Torres, 2001) (Annex II.1). El grau de polimerització s'estima com el quocient entre els mols de monòmer sense derivar (unitats terminals) i els mols totals del cru. Així, en un cru format per dímers, després de la despolimerització els monòmers sense derivar seran la meitat del total i el seu grau de polimerització serà de 2 (Selga *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2002b).

4.2 OPTIMITZACIÓ DE LES CONDICIONS DE SEPARACIÓ PER BESCANVI IÒNIC A ESCALA DE MIL-LIGRAM

Un objectiu principal del present treball és l'obtenció dels conjugats entre flavanols i cisteïna i els seus derivats. A partir dels resultats obtinguts anteriorment sobre el comportament cromatogràfic de les barreges despolimeritzades amb cisteïna i cisteïna, es van preparar els conjugats amb L-cisteïna (CYS), èster etílic de L-cisteïna (OET), N-acetil-L-cisteïna (NAC) i N-acetil-O-metilcisteïna (NAMC) a partir de la fracció OW.

Primerament, la despolimerització de la fracció OW mitjançant els diferents tiols es portà a terme a escala de mil·ligram segons es descriu a l'apartat 3.3.2.1.2 i les condicions d'elució seguien l'esquema de l'apartat 3.3.3.2 obtenint-se els crús corresponents amb un patró de despolimerització semblant a l'observat en la Figura 14.

Per l'escalat s'empraren reïnes hidrofíliques Macro Prep (de Biorad) per realitzar l'intercanvi iònic en comptes de la reïna Mono (d'Amersham) emprada a escala analítica pel seu alt cost.

Determinació de la capacitat de la columna

S'optimitzà la quantitat de mostra a carregar en la reïna de bescanvi iònic. La quantitat òptima per ambdues reïnes Macro Prep de 5,5 mL de VC fou de 25 mL de mostra OW-CYS, que equival a 50 mg de flavanols derivats amb CYS, 200 mg d'excés de CYS i altre material polimèric. També es va poder carregar el doble sense sobrepassar la capacitat de la columna, però s'obtingué una deficiente separació entre els productes de rentat i els d'interès. Per això s'adoptà una solució de compromís entre quantitat a carregar i separació.

Derivats de cisteïna

Equilibrada la reïna amb tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2.25/ EtOH 7:3, es carregà el cru OW-CYS (25 mL). Primer s'elüïren els productes no derivats 1-3 en condicions semblants a les analítiques (tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2.25/EtOH 7:3, en 4 volums de columna). Una menor quantitat de solvent resultà en una retenció no desitjada del (-)-epicatequin 3-O-galat (3) i una major provocà una elució massa ràpida dels conjugats amb càrrega (7 i 8) per l'efecte descrit a l'apartat 4.1.2. Seguidament, s'elüïren els productes d'interès 7-9 minimitzant les interaccions hidrofòbiques i iòniques emprant tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2,25/EtOH 13:7 i 100 mM clorur sòdic en 8 VC, tot deixant a la columna altres impureses que

s'elüïren amb un rentat final (tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2,25/EtOH 3:2 i 1 M clorur sòdic en 10 VC).

Els volums descrits es van optimitzar mitjançant la recollida de fraccions i el seu estudi analític en fase reversa Vydac C18 (apartat 3.3.5.1) emprant condicions isocràtiques de 11% de [D] (per a 7 i 8) i 17% de [D] (per a 9).

Els altres derivats corresponents a la tiòlisi amb OET, NAC i NAmC s'optimitzaren de la mateixa manera, ajustant en cada cas concret la quantitat de co-solvent i els volums de columna per una elució eficient.

4.3. SÍNTESI, SEPARACIÓ I PURIFICACIÓ DELS S-CISTEINIL DERIVATS DE FLAVANOLS A ESCALA DE GRAMS

La intenció era disposar d'una col·lecció de conjugats de flavanols i derivats de cisteïna amb diferents propietats físico-químiques amb l'objectiu de modular l'activitat dels flavanols mitjançant la part no polifenòlica de la molècula. Es va pensar sobretot que aquesta podria influir en el transport cel·lular del flavanol.

4.3.1 Preparació del cru contenint S-cisteinil derivats de flavanols

4.3.1.1 Preparació de derivats de cisteïna a partir del cru de *Vitis vinifera*

Es va emprar a escala de grams la fracció aquosa AQV (Esquema 1, en l'apartat 3.3.1.1) que és una fracció residual en el procés d'obtenció de la fracció OW. Aquesta darrera va ser útil pels estudis d'optimització per ser més complexa que l'AQV pel que fa al contingut en monòmers.

Per això es pensà que les condicions trobades amb OW es complirien amb facilitat per a AQV. Per altra banda, utilitzar la AQV fou un repte per fet de contenir molt material no polifenòlic que probablement interaccionà amb els productes d'interès i que, de fet, dificultà la seva purificació dels productes finals. Per això, i pel fet que els polímers són menys apreciats que els oligòmers, aquesta fracció es considerà en el seu dia com un residu en el procés d'obtenció de OW.

En la literatura, la despolimerització en medi àcid és realitzada amb un excés de tiol de 25 a 50 vegades respecte la quantitat de proantocianidines (Prieur *et al.*, 1994; Rigaud *et al.*, 1991; Souquet *et al.*, 1996; Souquet *et al.*, 2000).

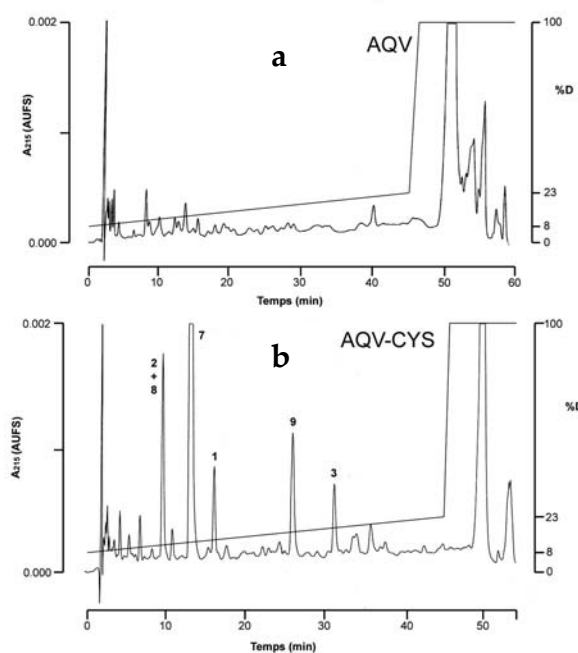


Figura 18. Perfils de cromatografia en fase reversa corresponent al procés de despolimerització en medi àcid. (a) Fracció AQV. (b) Cru tractat amb cisteïna, tal com es descriu a l'apartat 3.3.2.1.3. Columna, VYDAC C18, 300 Å, 5 µm, 250×4,6 mm. Càrrega a, 25 µL (~37 µg de polifenols). Càrrega b, 25 µL (5 µg de polifenols). Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Gradient de 8% a 23% [D] en 45 min. Flux 1,5 mL/min.

Normalment, aquesta reacció es porta a terme en MeOH, en presència d'àcid clorhídric 0,2 M i un excés de 50 vegades en pes del toluen- α -tiol, durant 10 min a 60°C (Souquet *et al.*, 1996) ó 2 min a 90°C (Souquet *et al.*, 2000).

El propòsit de realitzar-ho a escala de grams va implicar una reducció en la quantitat de reactiu a emprar. La reacció es va portar a terme tot seguint el protocol descrit a l'apartat 3.3.2.1.3, en el qual s'escalaren les quantitats emprades en l'estudi analític (apartat 3.3.2.1.1) i la quantitat de cisteïna fou 10 vegades menor. Un gran excés de reactiu s'empra per a assegurar una despolimerització completa en el temps de reacció establert. A major escala s'observà que una reducció en la quantitat de tiol aconseguia un perfil de despolimerització semblant (Figura 18). El cru després de la despolimerització de AQP s'anomenà AQP-CYS.

4.3.1.2 Preparació de derivats de cisteïna a partir del cru de *Pinus pinaster*

Aquest altre recurs natural ric en polímers de catequina i epicatequina es troba lliure de grups galats (Tourino *et al.*, 2005), els quals són capaços de generar respostes en la maquinaria cel·lular (Ahmad *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1998).

Així, una font lliure de grups galats permetria l'obtenció de productes flavanòlics en el que l'efecte destacat fos la capacitat antioxidant.

S'emprà escorça molturada (200 g) per a l'extracció (AQP) i posterior despolimerització, tal i com es descriu a l'apartat 3.3.2.2. La principal diferència fou la utilització d'aigua acidificada a 90°C (1,2 L) per a l'extracció en comptes de metanol a 60°C. La utilització d'aigua a elevada temperatura ja està descrita com a mètode alternatiu a l'extracció amb dissolvents orgànics (Sears *et al.*, 1968).

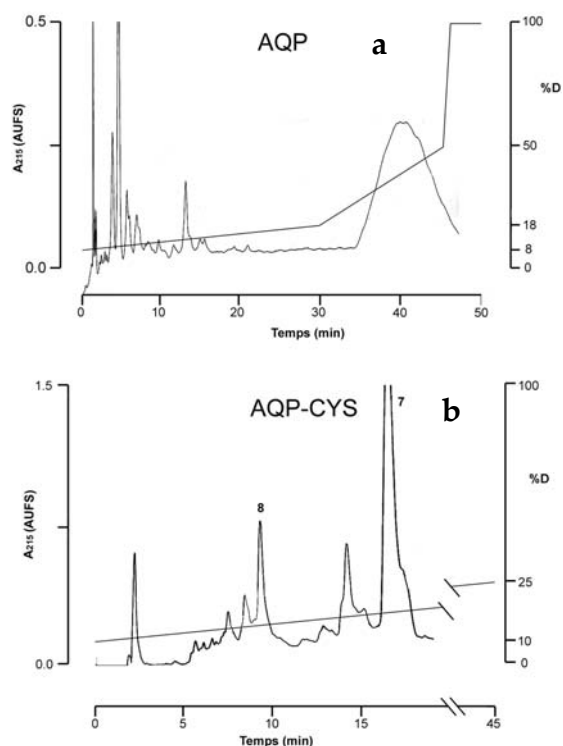


Figura 19. Perfils de cromatografia en fase reversa del procés de despolimerització. (a) Fracció AQP. (b) Cru tractat amb cisteïna. Columna, VYDAC C18. Càrrega **a**, 25 μ L (~37 μ g de polifenols). Càrrega **b**, 25 μ L (5 μ g de polifenols). Gradient de 8% a 18% [D] en 30 min i de 18% a 50% [D] en 20 min per (a). De 10% a 25% [D] en 45 min per (b). Flux 1,5 mL/min.

Aquesta millora en l'elecció del solvent evita haver de diluir la mostra i eliminar posteriorment el solvent orgànic. El temps de tiòlisi també ha estat optimitzat (2 h) per aconseguir uns resultats semblants als obtinguts amb metanol (Selga *et al.*, 2004) ja que un major període d'extracció en aquestes condicions augmenta les polimeritzacions no desitjades i el rendiment de la tiòlisi entra en una fase de saturació. El cru després de la despolimerització s'anomenà AQP-CYS (Figura 19).

Aquest es deixà refredar i la solució resultant es filtrà al buit. El residu sòlid d'escorça es rentà 4-5 cops amb aigua per tal d'arrossegar els productes d'interès que hagin quedat absorbits. El cru de AQP-CYS resultant (2,5 L) s'emmagatzemà a 4 °C i en l'obscuritat.

4.3.1.3 Preparació de derivats de cisteïna a partir del cru d'*Hamamelis virginiana*

Per altra banda, es buscà una tercera font natural de polímers de flavanols rics en grups galats. Aquesta es trobà en l'arbust d'*Hamamelis virginiana*, on la seva escorça conté aproximadament un 5% de proantocianidina polimèrica (Dauer *et al.*, 2003).

Aquesta font s'emprà per a l'obtenció del producte gal·loïtzat **9**, degut al pobre rendiment obtingut a partir del cru AQV (de *Vitis vinifera*).

El temps d'extracció en aigua i la temperatura de despolimerització foren idèntics als emprats amb l'extracte de *Pinus pinaster*. En aquest cas, s'optimitzà la quantitat d'aigua mínima per a l'extracció així com la L-cisteïna per a una despolimerització efectiva, tal com es descriu a l'apartat 3.3.2.3.1.

Les condicions òptimes per a una quantitat determinada de troncs petits d'*Hamamelis* (3,15 g) foren: Extracció amb aigua destil·lada i filtrada (12 mL) acidificada amb HCl 37 % (v/v) (75 µL) a 90°C sota N₂.

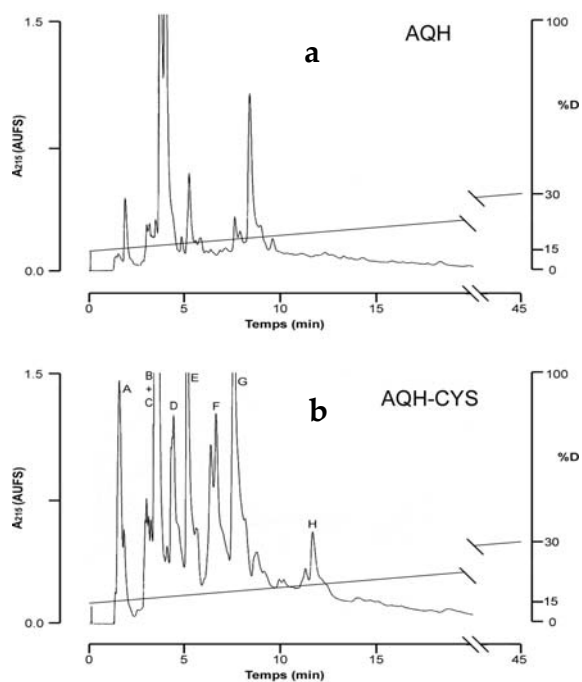


Figura 20. Perfils de cromatografia en fase reversa del procés de despolimerització. (a) Fracció AQH. (b) Cru tractat amb cisteïna, tal com es descriu a l'apartat 3.3.2.3. Columna, VYDAC C18. Càrrega a, 25 µL (~37 µg de polifenols). Càrrega b, 25 µL (5 µg de polifenols). Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Gradient de 15% a 30% [D] en 45 min. Flux 1,5 mL/min.

El cru d'extracció s'anomenà AQH. Un cop assolida la temperatura d'extracció, s'addicionà la L-cisteïna (404 mg, diluït amb el mínim volum d'aigua) i es mantingué a reflux durant 2 h. Una major quantitat de tiol no feu augmentar proporcionalment la despolimerització. Seguidament es refredà i la solució resultant (AQH-CYS) es filtrà al buit (Figura 20).

En l'escalat s'augmentaren 10 vegades les quantitats. Així, l'extracció i despolimerització amb L-cisteïna a partir de troncs petits d'*Hamamelis* (3,2 kg) es realitzà en 8 etapes idèntiques de 400 g de troncs cadascuna, tal com es descriu a l'apartat 3.3.2.3.2. Al acabar, els crus d'extracció i despolimerització (AQH-CYS) es reuniren (16 L).

4.3.2 Separació i purificació dels S-cisteïnil derivats de flavanols a partir de *Vitis vinifera*

4.3.2.1 Separació per bescanvi catiònic

Les condicions òptimes de càrrega màxima (25 mL d'AQV-CYS, ~50 mg de flavanols) i elució, obtingudes en una columna de 5,5 mL de VC es van escalar unes 20 vegades (càrrega de 500 mL de cru AQV-CYS, ~1000 mg de flavanols) en una columna de 105 mL de VC empaquetada amb la mateixa reïna Macro Prep High S (apartat 3.3.3.3). El flux lineal en les dues escales va ser semblant per tal de poder reproduir, proporcionalment, el volums d'elució dels diversos compostos.

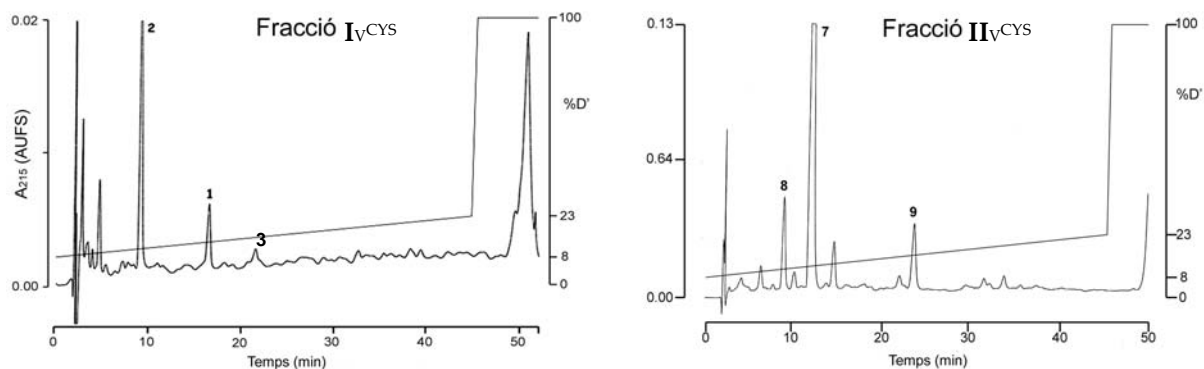


Figura 21. Perfils de cromatografia en fase reversa on es mostra el contingut de cada fracció després del bescanvi catiònic. La Fracció I_V^{CYS} conté quasi exclusivament els monòmers sense derivar. La Fracció II_V^{CYS} presenta majoritàriament els productes derivats. Columna, Vydac C18, 300 Å; 5 µm; 250×4,6 mm. Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Càrrega, 100 µL. Gradient 8% a 23% [D'] en 45 min. Flux 1,5 mL/min.

Per cada alíquota de mostra a carregar (vuit en total), es van seguir les condicions d'elució següents: Després de carregar la reïna i eluir tot allò que no es retengués amb tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2,25/EtOH (9:1), es recollí una primera fracció I_V^{CYS} eluïda amb tampó fosfat

sòdic 20 mM, pH 2,25/ EtOH (7:3), en 4 VC, i una fracció $\text{II}_{\text{V}^{\text{CYS}}}$ eluïda amb tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2,25/ EtOH (13:7), 100 mM clorur sòdic, en 5 VC. Es generà així el primer pas de purificació on la fracció $\text{II}_{\text{V}^{\text{CYS}}}$ (3,5L) contenia els derivats 7, 8 i 9 (Figura 21).

4.3.2.2 Separació per fase reversa

Partint de la fracció $\text{II}_{\text{V}^{\text{CYS}}}$ (3,5 L, ~4 g de flavanols derivats) obtinguda del bescanvi catiònic del cru AQV-CYS, es va evaporar al màxim el solvent i la solució resultant (1,8 L) es diluí amb aigua fins un volum final de 2,5 L. La separació es va dur a terme en HPLC de fase reversa en columna Vydac C18 a escala de grams (apartat 3.3.5.2), on va ser carregada en tres alíquotes de ~900 mL cadascuna. Cada alíquota es va eluir sota un gradient de 8% a 23% de [D'] durant 45 min i en 0,1% (v/v)TFA. Es van recollir fraccions enriquides en cadascun dels tres compostos d'interès: Fracció $\text{IV}_{\text{V}^{\text{CYS}}}$ (7 L, 2-5% de CH_3CN), fracció $\text{V}_{\text{V}^{\text{CYS}}}$ (6 L, 5-8% de CH_3CN) i fracció $\text{VI}_{\text{V}^{\text{CYS}}}$ (2,5 L, 10-13% de CH_3CN , Figura 22).

Aquestes fraccions van ser utilitzades per a purificar cadascun dels compostos conjugats 7-9 emprant cromatografia en fase reversa.

Per a analitzar les fraccions que s'anaren generant i controlar l'elució dels diferents productes s'emprà la columna Vydac C18 (apartat 3.3.5.1), amb elució isocràtica al 11% [D] per a 7 i 8, i 17% de [D] per a 9.

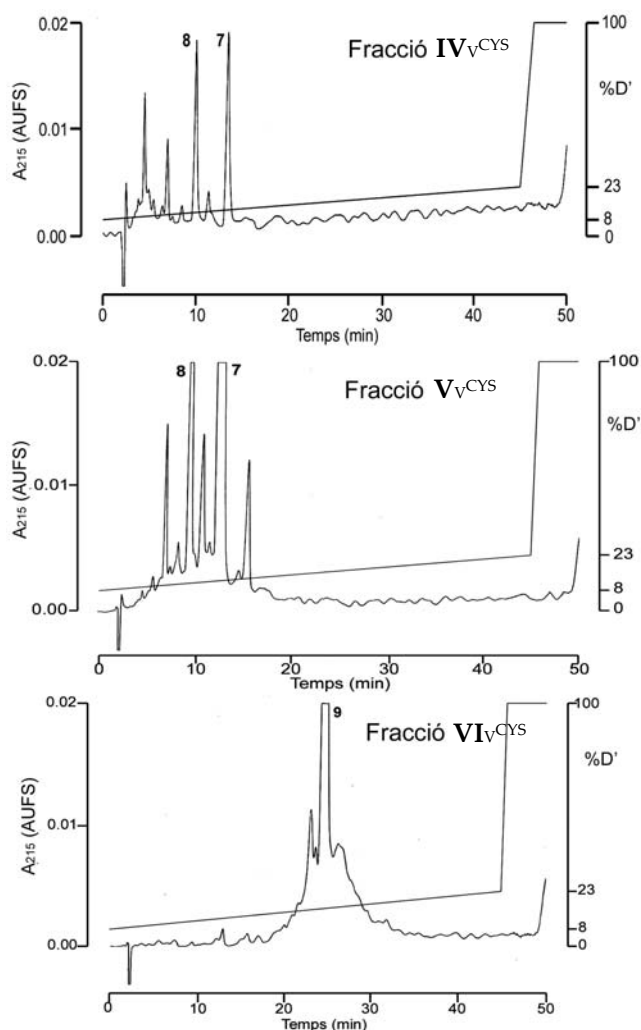


Figura 22. Perfils de cromatografia en fase reversa. Les Fraccions $\text{IV}_{\text{V}^{\text{CYS}}}$ i $\text{V}_{\text{V}^{\text{CYS}}}$ contenen els monòmers derivats 7 i 8. La Fracció $\text{VI}_{\text{V}^{\text{CYS}}}$ presenta exclusivament el derivat 9, entre d'altres impureses. Columna, Vydac C18. Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Càrrega, 100 μL . Gradient 8% a 23% [D'] en 45 min. Flux 1,5 mL/min

4.3.2.3 Purificació per fase reversa i caracterització dels *S*-cisteinil derivats de flavanols

Es va pensar en una estratègia que incorporés variacions de modificadors a la fase mòbil tot utilitzant la mateixa fase estacionària (apartat 3.3.6). Es van fer successius fraccionaments en TEAP pH 2,25 i pH 5,54 i en TFA, sent aquest últim el contrari emprat per liofilitzar. Abans, es comprovà que a pH 5,54 els productes no es fessin malbé. Amb aquests canvis de tampó es va treure profit de la diferent selectivitat de la fase mòbil pels productes i les impureses.

4.3.2.3.1 Obtenció de 4 β -(*S*-cisteinil)epicatequina (7)

La fracció $V_{V^{CYS}}$ conté majoritàriament el producte 7. S'evaporà el solvent i es carregà a la columna (4,5 L). La Taula 10 resumeix les condicions cromatogràfiques, on s'utilitzà una columna preparativa Vydac C18 de 300 Å, 15-20 μ m, 300x47 mm i flux 100 mL/min. El seguiment analític es va fer en una columna Vydac C18 de 5 μ m; 250x4,6 mm i flux 1,5 mL/min mitjançant una elució isocràtica a 11%[D]. Abans de començar el següent pas cromatogràfic les fraccions es diluïren amb aigua en proporció 1:1.

Taula 10. Condicions cromatogràfiques de purificació de 7 a partir de la fracció $V_{V^{CYS}}$.

Càrrega	Eluents	Gradient	% [F] d'elució	Fracc. obtinguda
Fracció $V_{V^{CYS}}$	[E]: TEAP2,25 [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega a 0%[F] 0 → 20%[F], 60min	0-4%[F] 7-11%[F]	s'ajuntà a $IV_{V^{CYS}}$ TEAP1
TEAP1	[E]: TEAP2,25 [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega a 0%[F] 0 → 10%[F], 45min	6-7%[F] 8-11%[F]	s'ajuntà a $IV_{V^{CYS}}$ TEAP2
TEAP2	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega a 3%[F] 3 → 18%[F], 30min	7-14%[F]	TFA3
TFA3	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega a 0%[F] 0 → 15%[F], 30min	12-17%[F]	TFA4
TFA4	[E]: TEAP5,54 [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega a 0%[F] 0 → 20%[F], 90min	7-9%[F]	TEAP5
TEAP5	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega a 0%[F] 0 → 90%[F], 10min	--	TFA6

La fracció TFA6 es va liofilitzar per obtenir la 4 β -(*S*-cisteinil)epicatequina 7 (550 mg) com a sal trifluoroacètica. La puresa (>99,5%) va ser quantificada per RP-HPLC en una columna μ RPC C2/C18 i eluents [C]: 0.10%(v/v) TFA en H₂O Milli-Q i [D']: 0,09%(v/v) TFA en H₂O Milli-Q /CH₃CN (2:3), sota un gradient de 8% a 23% de [D'] durant 45 min i un flux de 200 μ L/min amb detecció simultània a 214, 280 i 320 nm (Annex I.2).

Espectrometria de masses

Amb el mètode d'electrosprai positiu, s'obtingué un ió molecular de 410,0 (M+1)⁺, que correspon a la massa molecular del producte esperat calculada per C₁₈H₂₀N₁O₈S₁ (M+H)⁺ 410,1 g/mol (Annex I.3).

Ressonància magnètica nuclear

El producte purificat va ser sotmès a RMN-¹H (Annex I.3). Els desplaçaments químics obtinguts, fent servir TMS com a patró intern, van ser els següents:

RMN-¹H ((CD₃)₂CO + 3 gotes de D₂O, 300 MHz): δ 3.,98 (1H, d J=1,8Hz; 4-H configuració 3, 4-*trans*); 4,08 (1H, dd J=2,1 i 0,9Hz; 3-H); 4,45 (1H, m; S-CH₂-CH<); 5,09 (1H, s; 2-H configuració 2, 3-*cis*); 5,89 (1H, d J=2,1Hz; 8-H); 6,10 (1H, d J=2,1Hz; 6-H); 6,77-6,86 (2H, m; 5'-H, 6'-H); 7,07 (1H, d J=2,1Hz; 2'-H).

L'assignació de les configuracions dels carbonis 3 i 4 es va fer seguint Thompson *et al.* (Thompson *et al.*, 1972).

4.3.2.3.2 Obtenció de 4 β -(S-cisteinil)catequina (8)

La fracció IV_{V^{CYS}} conté majoritàriament el producte 8. S'evaporà el solvent i es carregà a la columna (5 L). La Taula 11 resumeix les condicions cromatogràfiques, on per a l'obtenció de les fraccions TEAP1 i TEAP2 es va emprar la columna Vydac descrita a l'apartat 4.3.2.3.1. Les següents fraccions es van obtenir emprant la columna Perkin-Elmer C18 25x2 cm. El seguiment analític es feu com en l'apartat 4.3.2.3.1 sota una elució isocràtica a 8%[D]. En cada pas cromatogràfic les fraccions es van diluir amb aigua en proporció 1:1.

Taula 11. Condicions cromatogràfiques de purificació de 8 a partir de la fracció IV_{V^{CYS}}.

Càrrega	Eluents	Gradient	% [F] d'elució	Fracc. obtinguda
Fracció IV _{V^{CYS}}	[E]: TEAP2,25 [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega a 0%[F] 0 → 20%[F], 90min	4-7%[F]	TEAP1
TEAP1	[E]: TEAP5,54 [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega a 0%[F] 0 → 20%[F], 90min	4-6%[F]	TEAP2
TEAP2	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega a 0%[F] Isocràtic 10%[F]	10%[F]	TFA3
TFA3	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega a 0%[F] Isocràtic 15%[F]	15%[F]	TFA4

La fracció TFA4 es va liofilitzar per obtenir la 4 β -(S-cisteinil)catequina 8 (74 mg) com a sal trifluoroacètica. La puresa (>99,9%) va ser quantificada per RP-HPLC en el mateix sistema descrit pel compost 7 (Annex I.2).

Espectrometria de masses

Igual que l'anterior, s'obtingué un ió molecular de 409,9 (M+1)⁺, que correspon a la massa molecular del producte esperat calculada per C₁₈H₂₀N₁O₈S₁ (M+H)⁺ 410,1 g/mol (Annex I.4).

Ressonància magnètica nuclear

El producte purificat va ser sotmès a RMN-¹H. Els desplaçaments químics obtinguts, fent servir TMS com a patró intern, van ser els següents:

RMN-¹H ((CD₃)₂CO + 3 gotes de D₂O, 300 MHz): δ 4,15 (1H, 2d J=9,9 i 4,5Hz; 3-H); 4,28 (1H, d J=4,5Hz; 4-H configuració 3, 4-cis); 4,40 (1H, m; S-CH₂-CH<); 4,80 (1H, d J=9,6Hz; 2-H configuració 2, 3-trans); 5,76 (1H, d J=2,1Hz; 8-H); 6,12 (1H, d J=2,1Hz; 6-H); 6,78 (2H, m; 5'-H, 6'-H); 6,93 (1H, d J=1,2Hz; 2'-H).

L'assignació de les configuracions dels carbonis 3 i 4 es feu com en el derivat 7 (Annex I.4).

4.3.2.3.3 Obtenció de 4β-(S-cisteinil)epicatequin 3-O-galat (9)

La fracció VI_V^{CYS} conté majoritàriament el producte 9. S'evaporà el solvent i es carregà a la columna (1,5 L). La Taula 12 resumeix les condicions cromatogràfiques per a l'obtenció d'aquest producte, on s'utilitzà la columna Vydac descrita a l'apartat 4.3.2.3.1. El seguiment analític es feu com en l'apartat 4.3.2.3.1 sota una elució isocràtica a 17%[D]. En cada pas cromatogràfic les fraccions es van diluir amb aigua en proporció 1:1.

Taula 12. Condicions cromatogràfiques de purificació de 9 a partir de la fracció VI_V^{CYS}.

Càrrega	Eluents	Gradient	% [F] d'elució	Fracc. obtinguda
Fracció VI _V ^{CYS}	[E]: TEAP2,25 [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega a 3%[F] 3 → 23%[F], 60min	14-16%[F]	TEAP1
TEAP1	[E]: TEAP5,54 [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega a 3%[F] 3 → 23%[F], 60min	14-15%[F]	TEAP2
TEAP2	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega 15%[F] 15 → 35%[F], 30min	22-23%[F]	TFA3

La fracció TFA3 es va liofilitzar per obtenir la 4β-(S-cisteinil)epicatequin 3-O-galat 9 (75 mg) com a sal trifluoroacètica. La puresa (>99,9%) va ser quantificada per RP-HPLC en el mateix sistema descrit pel compost 7 (Annex I.2).

Espectrometria de masses

De la mateixa manera, s'obtingué un ió molecular de 561,9 (M+1)⁺, que correspon a la massa molecular del producte esperat calculada per C₂₅H₂₄N₁O₁₂S₁ (M+H)⁺ 562,1 g/mol (Annex I.5).

Ressonància magnètica nuclear

El producte purificat va ser sotmès a RMN-¹H. Els desplaçaments químics obtinguts, fent servir TMS com a patró intern, van ser els següents:

RMN-¹H ((CD₃)₂CO + 3 gotes de D₂O, 300 MHz): δ 4,15 (1H, d J=2,1Hz; 4-H configuració 3, 4-*trans*); 4,37 (1H, m; S-CH₂-CH<); 5,28 (1H, 2m; 3-H); 5,39 (1H, bs; 2-H configuració 2, 3-*cis*); 6,01 (1H, d J=2,4Hz; 8-H); 6,13 (1H, d J=2,1Hz; 6-H); 6,78 (1H, d J=8,1Hz; 5'-H); 6,90 (1H, dd J=2,1 i 8,1Hz; 6'-H); 6,97 (2H, s; H del galoil); 7,11 (1H, d J=2,1Hz; 2'-H). L'assignació de les configuracions dels carbonis 3 i 4 es feu com en el derivat 7 (Annex I.5).

4.3.2.4 Purificació per fase reversa de l'epicatequin 3-O-galat (**3**)

Per identificar la composició de les fraccions s'han de tenir patrons per realitzar co-elucions. La (-)-epicatequina s'obté comercialment, però la (-)-epicatequin 3-O-galat no es subministra. Així, es va obtenir el producte **3** per a utilitzar-lo com a patró.

Es partí de la fracció $I_{V^{CYS}}$ (2,7 L), obtinguda del rentat del bescanvi iònic del cru AQV-CYS, i que conté els monòmers no derivats. S'eliminà al màxim el solvent i la solució resultant (1,8 L) es carregà a la columna de fase reversa tal com es descriu a la Taula 13, on s'utilitzà la columna Vydac descrita a l'apartat 4.3.2.3.1. Per a l'obtenció de les fraccions TFA1 i TFA2 es va emprar una columna Perkin-Elmer C18 25x2 cm. El seguiment analític es feu com en l'apartat 4.3.2.3.1 sota una elució isocràtica a 19%[D]. En cada pas cromatogràfic les fraccions es van diluir amb aigua en proporció 1:1.

Taula 13. Condicions cromatogràfiques de purificació de **3** a partir de la fracció $I_{V^{CYS}}$.

Càrrega	Eluents	Gradient	% [F] d'elució	Fracc. obtinguda
Fracció $I_{V^{CYS}}$	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega 10%[F] 15 → 55%[F], 60min	33-37%[F]	TFA1
TFA1	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega 10%[F] 15 → 55%[F], 60min	35-37%[F]	TFA2
TFA2	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega 20%[F] 25 → 45%[F], 30min	37-39%[F]	TFA3

La fracció TFA3 es va liofilitzar per obtenir l'epicatequin 3-O-galat **3** (10 mg). La puresa (>99,8%) va ser quantificada per RP-HPLC en el mateix sistema descrit pel compost **7** (Annex I.6).

Espectrometria de masses

Amb l'electrosprai negatiu s'obtingué un ió molecular de 441,0 (M-1)⁻, que correspon a la massa molecular del producte esperat calculada per C₂₂H₁₈O₁₀ (M-H)⁻, 441,1 g/mol (Annex I.7).

Ressonància magnètica nuclear

El producte purificat va ser sotmès a RMN-¹H. Els desplaçaments químics obtinguts, fent servir TMS com a patró intern, van ser els següents:

RMN-¹H ((CD₃)₂CO + 3 gotes de D₂O, 300 MHz): δ 2,87 (1H, dd J=17,7 i 2,2Hz; 4βH); 2,99 (1H, dd J=17,8 i 4,3Hz; 4αH); 5,05 (1H, s; 2-H); 5,42 (1H, m; 3-H); 5,97 (1H, d J=2,4Hz; 8-H); 6,01 (1H, d J=2,4Hz; 6-H); 6,73 (1H, d J=8,1Hz; 5'-H); 6,84 (1H, dd J=2,1 i 8,0Hz; 6'-H); 6,98 (2H, s; H del galloil); 7,04 (1H, d J=1,6Hz; 2'-H). Apart de la senyal de l'aigua (3,7 ppm) i de l'acetona (2 ppm) com a dissolvents, també s'observà un triplet i un quadruplet corresponent a l'etanol (1,3 i 3,2 ppm). L'assignació dels dos hidrogens de C-4 es feren segons Hemingway *et al.* (Hemingway *et al.*, 1996)(Annex I.7).

4.3.3 Separació i purificació dels S-cisteinil derivats de flavanols a partir de *Pinus pinaster*

L'escorça de *Pinus pinaster* s'emprà per obtenir més quantitat de 4β-(S-cisteinil)epicatequina (7) perquè aquesta font és més rica en epicatequina que la brisa de *Vitis vinifera*.

4.3.3.1 Separació per hidrofobicitat en XAD16

A diferència del anterior, aquest cru ha estat obtingut mitjançant una extracció en aigua, generant un volum elevat de la solució d'interès (2,4 L) i contenint més quantitat de derivats i de cisteïna en excés que el cru anterior AQP-CYS. Si s'emprés el procediment establert per separar amb la reïna de bescanvi, es necessitarien moltes càrregues amb la subsegüent utilització d'un gran volum d'eluent orgànic. Per a fer el procés més competitiu, es buscà un altre tipus de reïna més econòmica i poder així augmentar el volum a carregar en la reïna. Es trobà en la reïna Amberlite XAD16 un bon candidat (Selga *et al.*, 2004). Aquesta presenta un adsorbent polimèric no-iònic i hidrofòbic amb una gran àrea superficial que exhibeix propietats aromàtiques. La capacitat d'adsorbir molècules hidrofòbiques contingudes en solvents polars (com ara l'aigua) és útil per purificar compostos del tipus isoflavones (Li-Hsun *et al.*, 2004) i polifenols, els quals serien adsorbits a la reïna per forces de Van der Waals entre els anells aromàtics.

Prèviament a la separació, es buscaren les condicions de càrrega de AQP-CYS i la quantitat d'etanol necessari per a la seva elució a escala de mil·ligrams. Les condicions cromatogràfiques venen descrites a l'apartat 3.3.4.1. A la columna Flash empaquetada amb la reïna XAD-16 (amb 32 mL de VC i fluxe de 2 mL/min), un cop rentada i equilibrada amb

0,2% àcid acètic en aigua Milli-Q, s'hi carregà una alíquota de AQP-CYS (100 mL, 3 VC). El següent VC (40 mL) s'eluí amb la solució d'equilibrat per tal d'eliminar tots aquells productes que no s'adsorbiren a la reïna. Seguidament s'inicià una elució isocràtica d'aigua/etanol (9:1) amb 0,2% d'àcid acètic, durant 2,5 VC. Al finalitzar, es varià l'isocràtic a aigua/etanol (8:2) amb 0,2% d'àcid acètic durant 2,5 VC més. Es seguí aquest procés amb els isocràtics d'aigua/etanol (7:3) i aigua/etanol (6:4) amb 0,2% d'àcid acètic. Per a cada condició isocràtica mesurada, es recolliren fraccions que foren analitzades per fase reversa amb les condicions descrites a 3.3.5.1 emprant la columna μ RPC amb el gradient de 10% a 25% de [D] en 45 min. El producte d'interès, en aquest cas el compost 7, s'eluí amb aigua Milli-Q/EtOH (7:3), mentre que les impureses s'elüïren amb aigua Milli-Q/EtOH (9:1).

A escala de grams, tal com descriu l'apartat 3.3.4.2, es treballà amb una columna Flash empaquetada amb la reïna XAD-16 (amb 900 mL de VC). Això permeté carregar tot el cru AQP-CYS (2,4 L, 3 VC) a la vegada, tal com es va fer a l'escala de mil·ligrams. Un cop equilibrada i carregada, es feu un rentat amb 0,5% d'àcid acètic en aigua (1 VC) i es recollí una fracció I_P^{CYS} eluïda amb aigua/ EtOH (9:1) en 0,5% d'àcid acètic (1,5 VC, uns 1,5 L). La fracció II_P^{CYS} s'eluí amb aigua/ EtOH (7:3) en 0,5% d'àcid acètic (3 VC, uns 3 L), contenint de forma majoritària el producte d'interès 7 (Figura 23). La separació fou controlada per fase reversa com s'indicà anteriorment.

Per a analitzar les fraccions s'emprà la columna Vydac C18 (apartat 3.3.5.1), amb un gradient de 10% a 25% [D] en 45 min.

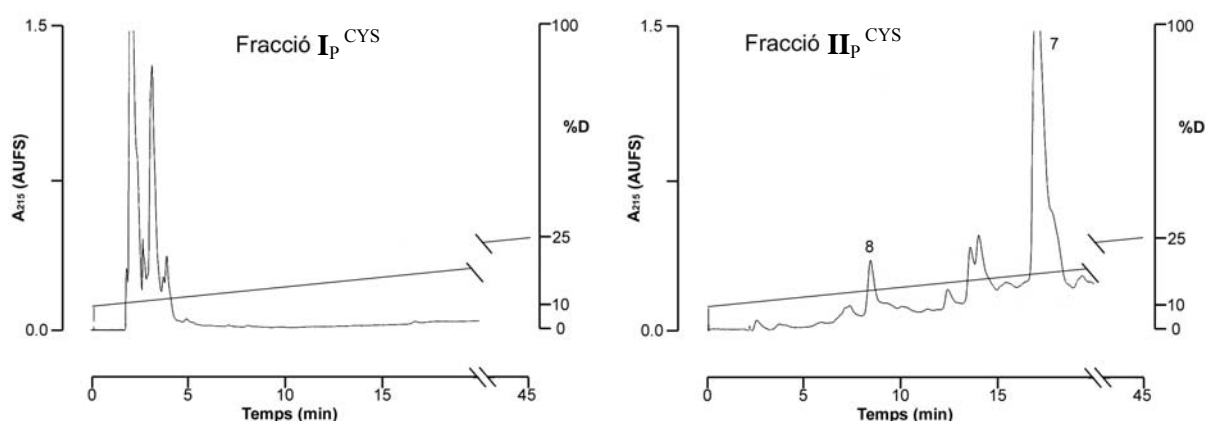


Figura 23. Perfils de cromatografia en fase reversa on es mostra el contingut de cada fracció després de la separació per XAD16. La Fracció I_P^{CYS} conté la part d'extracte que no es reté. La Fracció II_P^{CYS} presenta majoritàriament els productes derivats. Columna, μ RPC, 120 Å; 3 μ m; 100×2,1 mm. Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Càrrega, 20 μ L. Gradient 10% a 25% [D] en 45 min. Flux 200 μ L/min.

4.3.3.2 Purificació per fase reversa

4.3.3.2.1 Obtenció de 4β-(S-cisteinil)epicatequina (7)

La fracció II_P^{CYS} conté majoritàriament el producte 7. S'evaporà el solvent i es carregà a la columna (2 L). La Taula 14 resumeix les condicions cromatogràfiques, on s'utilitzà una columna preparativa Vydac C18 de 300 Å; 15-20 μm; 300x47 mm i flux 80 mL/min. El seguiment analític es feu com en l'apartat 4.3.2.3.1 sota una elució isocràtica a 11%[D]. En cada pas cromatogràfic les fraccions es van diluir amb aigua en proporció 1:1.

Taula 14. Condicions cromatogràfiques de purificació de 7 a partir de la fracció II_P^{CYS} .

Càrrega	Eluents	Gradient	% [F] d'elució	Fracc. obtinguda
Fracció II_P^{CYS}	[E]: TEAP2,37 [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega a 0%[F] 0 → 20%[F], 45min	9-14%[F]	TEAP1
TEAP1	[E]: TEAP2,37 [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega a 0%[F] 0 → 20%[F], 45min	12-15%[F]	TEAP2
TEAP2	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (2:3)	Càrrega 3%[F] 3 → 18%[F], 30min	11-18%[F]	TFA3

La fracció TFA3 es va liofilitzar per obtenir la 4β-(S-cisteinil)epicatequina 7 (1,8 g) com a sal trifluoroacètica. La puresa (98,5%) va ser quantificada per RP-HPLC amb el mateix sistema descrit en l'apartat 4.3.2.3.1 (Annex I.6).

Espectrometria de masses

Amb el mètode d'electrosprai positiu, s'obtingué un ió molecular de 410,5 (M+1)⁺, comparable a l'obtingut en l'apartat 4.3.2.3.1 (Annex I.8).

Ressonància magnètica nuclear

El producte purificat va ser sotmès a RMN-¹H (Annex I.8). Els desplaçaments químics obtinguts, fent servir TMS com a patró intern, van ser els següents:

RMN-¹H (D₂O, 300 MHz): δ 3,49 (2H, dd $J=15,2$ i $3,9\text{Hz}$; S-CH₂-CH-); 3,96 (1H, d $J=2,0\text{Hz}$; 4-H configuració 3, 4-*trans*); 4,09 (1H, dd $J=2,2$ i $0,8\text{Hz}$; 3-H); 4,45 (1H, m; S-CH₂-CH<); 5,21 (1H, s; 2-H configuració 2, 3-*cis*); 5,98 (1H, d $J=2,1\text{Hz}$; 8-H); 6,08 (1H, d $J=2,0\text{Hz}$, 6-H); 6,83 (1H, d $J=8,1\text{Hz}$; 5'-H); 6,88 (1H, dd $J=8,1$ i $1,8\text{Hz}$; 6'-H); 7,06 (1H, d $J=1,8\text{Hz}$; 2'-H). L'assignació de les configuracions dels carbonis 3 i 4 es va fer seguint Thompson *et al.* (Thompson *et al.*, 1972).

4.3.4 Separació i purificació dels S-cisteinil derivats de flavanols a partir d'*Hamamelis virginiana*

L'escorça d'*Hamamelis virginiana* s'emprà per obtenir més quantitat de 4 β -(S-cisteinil)epicatequin 3-O-galat (9) perquè aquesta font és més rica en èsters de galat que la brisa de *Vitis vinifera*.

4.3.4.1 Separació per hidrofobicitat en XAD16

Aprofitant la metodologia desenvolupada en la separació del cru AQP-CYS i descrita en l'apartat 4.3.3.1, es va creure convenient aplicar-la en el cru de AQH-CYS (16 L), degut a que va ser obtingut de la mateixa manera.

S'utilitzà la columna i reïna descrita a l'apartat 3.3.4.2, equilibrant-la amb aigua i carregant 1 VC de AQH-CYS (1 L), observant-se una elució no desitjada dels compostos derivats. Es renovà la reïna XAD16 obtenint resultats similars, pel que el sistema de separació amb XAD16 no resultà òptim per utilitzar-ho amb el cru d'*Hamamelis*. Segurament, la resposta es trobà en la diferent natura dels extractes de *Pinus pinaster* (AQP) i d'*Hamamelis virginiana* (AQH) i la propietat inherent de l'adsorbent polimèric i aromàtic de la reïna. L'extracció aquosa d'*Hamamelis* conté grans quantitats de polisacàrids, constituïts principalment per unitats d'arabinosa i galactosa (Deters *et al.*, 2001). És possible que aquests també s'adsorbeixin en la reïna i, al trobar-se en excés, saturin la reïna.

4.3.4.2 Separació per bescanvi catiònic

Obviant la separació per hidrofobicitat pels motius anteriorment descrits, es retornà al bescanvi catiònic degut a que els compostos d'interès es troben derivats amb CYS i, prenent avantatge de la seva càrrega positiva, separar-los de la resta del cru, polisacàrids inclosos.

Es feu una prova de càrrega de la reïna Macro Prep High S (105 mL de VC, veure apartat 3.3.3.3). Un cop equilibrada amb tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2,60 (6 VC) es carregà part del cru AQH-CYS (fins a 9 VC) sense observar elució dels productes d'interès. Finalitzada la càrrega, la reïna es rentà amb tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2,60 (2 VC) per a eluir tot allò que no es reté. Seguidament s'eluí amb tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2,60/EtOH (7:3) recollint la fracció I_H^{CYS} (4 VC). Es canvià l'elució a tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2,60/EtOH (13:7), 100 mM clorur sòdic, recollint la fracció II_H^{CYS} (4 VC). Les impureses encara retingudes a la reïna foren eliminades amb tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2,60/ EtOH (3:2), 1

M clorur sòdic (4 VC). La fracció $\text{II}_{\text{H}}^{\text{CYS}}$ (0,4 L) contenia els pics E, G i H, on H resultà ser el conjugat 9 (Figura 24).

Les fraccions s'analitzaren per fase reversa emprant una columna Vydac C18 amb les condicions descrites a 3.3.5.1 i elució isocràtica al 16% [D].

Per a vèncer la limitació tecnològica que suposava treballar amb un cru de 16 L, s'empaquetà la reïna Macro Prep High S en una columna de vidre de 45×4,5 cm i 900 mL de VC (veure apartat 3.3.3.3). Un cop equilibrada amb tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2,31 (6 VC) es carregà part del cru AQH-CYS (6 VC) i es seguí el procés d'elució anteriorment descrit. El procés es repetí 3 vegades fins separar la totalitat del cru, i les fraccions s'ajuntaren respectivament a les ja separades fracció $\text{I}_{\text{H}}^{\text{CYS}}$ (10 L) i $\text{II}_{\text{H}}^{\text{CYS}}$ (11 L). Les fraccions s'analitzaren per fase reversa emprant una columna Vydac C18 amb les condicions descrites a 3.3.5.1 amb elució isocràtica al 16% [D].

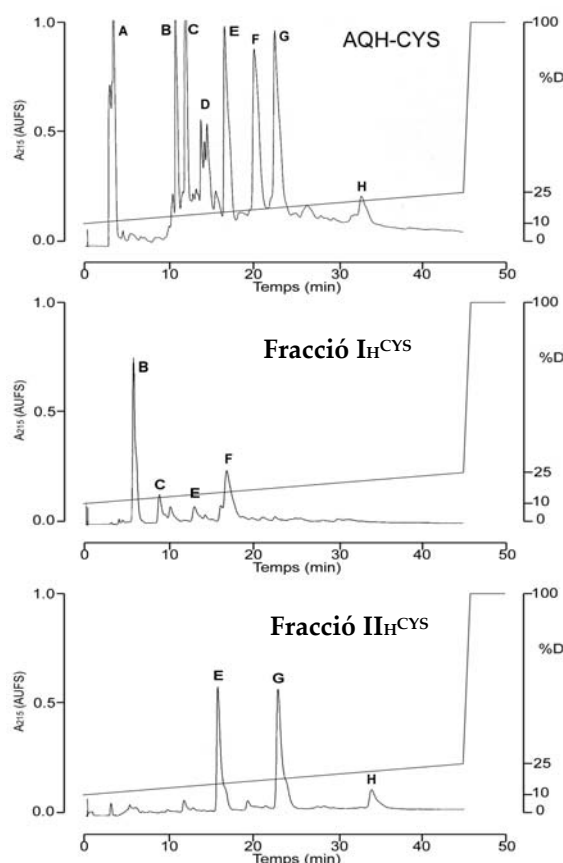


Figura 24. Perfils de cromatografia en fase reversa després de la separació per bescanvi. Fracció $\text{I}_{\text{H}}^{\text{CYS}}$, eluïda amb aigua/EtOH (7:3). Fracció $\text{II}_{\text{H}}^{\text{CYS}}$, eluïda amb aigua/EtOH (13:7) 100mM NaCl, presenta els productes derivats. Columna, μRPC , 120 Å; 3 μm ; 100×2,1 mm. Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Càrrega, 10 μL . Gradient 10% a 25% [D] en 45 min. Flux 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.

4.3.4.3 Purificació per fase reversa

4.3.4.3.1 Obtenció de 4 β -(S-cisteinil)epicatequin 3-O-galat (9)

La fracció $\text{II}_{\text{H}}^{\text{CYS}}$ conté majoritàriament el producte 9. S'evaporà el solvent i es carregà a la columna (6,3 L). La Taula 15 resumeix les condicions cromatogràfiques, on s'utilitzà una columna preparativa Vydac C18 de 300 Å; 15-20 μm ; 300×47 mm i flux 80 mL/min. El

seguiment analític es feu com en l'apartat 4.3.2.3.1 sota una elució isocràtica a 17%[D]. En cada pas cromatogràfic les fraccions es van diluir amb aigua en proporció 1:1.

Taula 15. Condicions cromatogràfiques de purificació de **9** a partir de la fracció **II_H^{CYS}**.

Càrrega	Eluents	Gradient	% [F] d'elució	Fracc. obtinguda
Fracció II_H^{CYS}	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 0%[F] 0 → 25%[F], 30min	20-23%[F]	TFA1
TFA1	[E]: TEAP5,53 [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 3%[F] 3 → 23%[F], 50min	12-16%[F]	TEAP2
TEAP2	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega 7%[F] 7 → 30%[F], 45min	15-21%[F]	TFA3
TFA3	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega 0%[F] Isocràtic 16%[F]	16%[F]	TFA4

La fracció TFA4 es diluí i es carregà amb el mateix isocràtic per tal d'anar enriquint-se amb el producte d'interès. Aquest procés es repetí 5 vegades fins obtenir la sal trifluoroacètica de 4β-(S-cisteinil)epicatequin 3-O-galat **9** (912 mg) amb una puresa del 97,0%, quantificada per RP-HPLC (apartat 4.3.2.3.1) (Annex I.6).

Espectrometria de masses

Amb el mètode d'electrosprai positiu, s'obtingué un ió molecular de 561,9 (M+1)⁺, que correspon a la massa molecular del producte esperat calculada per C₂₅H₂₄N₁O₁₂S₁ (M+H)⁺ 562,1 g/mol(Annex I.9).

Ressonància magnètica nuclear

El producte purificat va ser sotmès a RMN-¹H (Annex I.9). Els desplaçaments químics obtinguts, fent servir TMS com a patró intern, van ser els següents:

RMN-¹H ((CD₃)₂CO + 3 gotes de D₂O, 500 MHz): δ 3,80 (2H, dd J=14,6 i 4,5Hz; S-CH₂-CH<); 4,17 (1H, d J=1,5Hz; 4-H configuració 3, 4-*trans*); 4,60 (1H, m; S-CH₂-CH<); 5,32 (1H, m; 3-H); 5,39 (1H, s; 2-H configuració 2, 3-*cis*); 6,02 (1H, d J=2,3Hz; 8-H); 6,18 (1H, d J=2,3Hz; 6-H); 6,80 (1H, d J=8,0Hz; 5'-H); 6,90 (1H, dd J=2,0 i 8.0Hz; 6'-H); 6,98 (2H, s; H del galoil); 7,12 (1H, d J=2,0Hz; 2'-H). L'assignació de les configuracions dels carbonis 3 i 4 es feu com en el derivat **7**.

4.4 SÍNTESI, SEPARACIÓ I PURIFICACIÓ DELS S-(O-ETILCISTEINIL) DERIVATS DE FLAVANOLS A ESCALA DE GRAMS

4.4.1 Preparació del cru contenint S-(O-etilcisteinil) derivats de flavanols

El cru de *Vitis vinifera* es preparà d'identica manera a la descrita amb la cisteïna (apartat 4.3.1.1) tot emprant l'èster etílic del L-cisteïna (OET). Es seguí el procés descrit a l'apartat 3.3.2.1.3 i el cru resultant s'anomenà AQV-OET (4 L, ~1,5-2 g/L de polifenols amb OET, Figura 25)

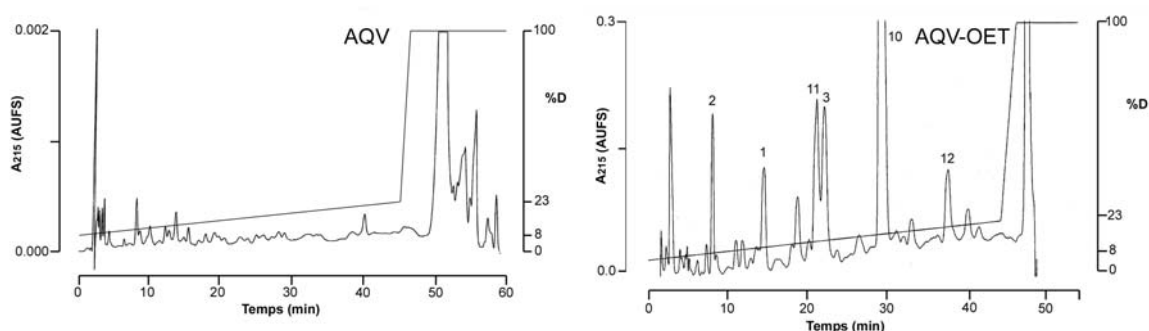


Figura 25. Perfils de cromatografia en fase reversa corresponent al cru AQV abans i després de la despolimerització en medi àcid amb OET, tal com es descriu a l'apartat 3.3.2.1.3. Columna, μ RPC. Càrrega AQV, 25 μ L (~37 μ g de polifenols). Càrrega AQV-OET, 20 μ L (4 μ g de polifenols). Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Gradient de 8% a 23% [D] en 45 min. Flux 200 μ L/min.

4.4.2 Separació i purificació dels S-(O-etilcisteinil) derivats de flavanols a partir de *Vitis vinifera*

4.4.2.1 Separació per bescanvi catiònic

Les condicions trobades a l'apartat 4.2 obtingudes en una columna de 5,5 mL de VC es van escalar unes 20 vegades (càrrega de 500 mL de cru AQV-OET, ~1.000 mg de flavanols) per una columna de 105 mL de VC empaquetada amb la mateixa reïna Macro Prep High S.

Equilibrada la reïna amb tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2,30/EtOH (7:3), es carregà una alíquota de AQV-OET. Després de la càrrega, es recollí una fracció de rentat eluïda amb tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2,30/EtOH (7:3) durant 4,5 VC on es trobaren els monòmers de 1 i 2. La fracció I^{vOET} eluïda amb tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2,30/EtOH (13:7) durant 3 VC contenia el monòmer galat 3. La fracció II^{vOET} eluïda amb tampó fosfat sòdic 20 mM, pH 2,25/EtOH (3:2), 100 mM clorur sòdic durant 5 VC presentà els monòmers derivats (Figura 26). Aquest procés de separació es repetí amb les set alíquotes restants.

Es generà així el primer pas de purificació on la fracció $\text{II}_{\text{V}}^{\text{OET}}$ (3,5 L) contenia els derivats **10-12** (tal i com es va obtenir amb els corresponents conjugats de cisteïna en l'apartat 4.3.2.1).

Per a analitzar les fraccions que s'anaren generant i controlar l'elució dels diferents productes s'emprà la columna Vydac C18 (apartat 3.3.5.1), amb elució isocràtica al 19% [D].

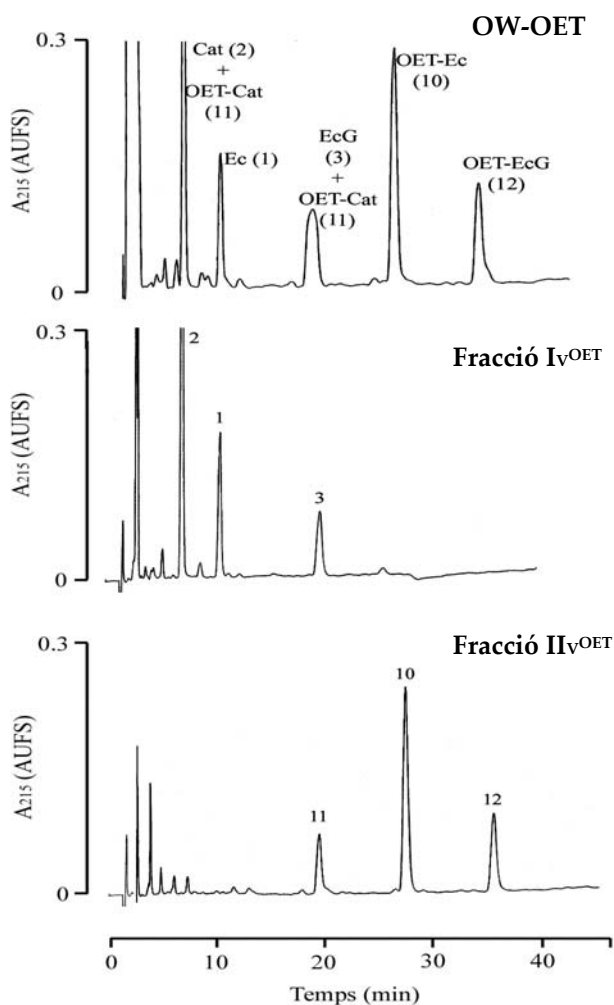


Figura 26. Perfils cromatogràfics del cru despolimeritzat amb OET (OW-OET). Fracció $\text{I}_{\text{V}}^{\text{OET}}$ conté els productes no retinguts per bescanvi catiònic (1-3). Fracció $\text{II}_{\text{V}}^{\text{OET}}$ conté els productes retinguts i eluïts amb NaCl (10-12). Columna μRPC . Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Càrrega OW-OET, 100 μL (~20 μg de polifenols); Fraccions, 100 μL (~10 μg de polifenols). Gradient 8% a 23% [D] en 45 min. Flux 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.

4.4.2.2 Separació per fase reversa

Partint de la fracció (3,5 L, ~4 g de flavanols derivats) obtinguda del bescanvi catiònic del cru AQV-OET, es va evaporar al màxim el solvent i la solució resultant (1,6 L) es diluï amb aigua fins un volum final de 3,8 L. La separació es va dur a terme en HPLC de fase reversa en columna Vydac C18 (apartat 3.3.5.2), on va ser carregada en quatre alíquotes de ~900 mL cadascuna.

Cada alíquota es va eluir sota un gradient de 5% a 25% de [D] durant 45 min i en 0,1% (v/v) TFA. Es van obtenir fraccions enriquides en cadascun dels tres compostos d'interès (Figura 27): Fracció $\text{IV}_{\text{V}^{\text{OET}}}$ (4 L, 9-11% de CH_3CN), fracció $\text{V}_{\text{V}^{\text{OET}}}$ (5 L, 12-16% de CH_3CN) i fracció $\text{VI}_{\text{V}^{\text{OET}}}$ (2 L, 17-19% de CH_3CN). Aquestes fraccions van ser utilitzades per a purificar cadascun dels compostos conjugats **10-12** emprant cromatografia en fase reversa a escala de grams.

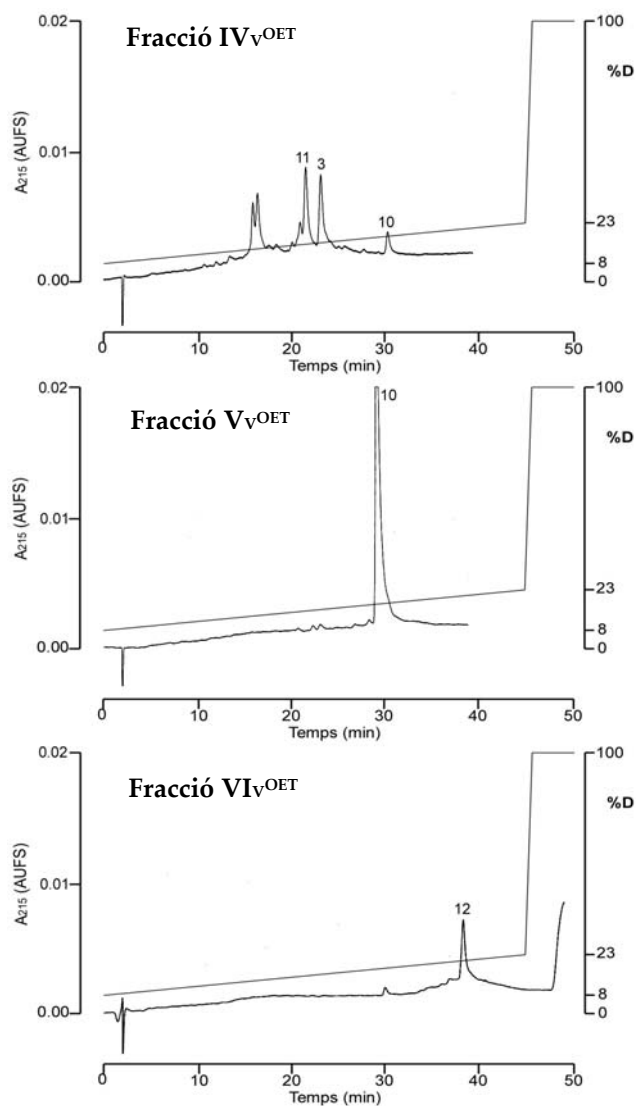


Figura 27. Perfils de cromatografia en fase reversa. Fracció $\text{IV}_{\text{V}^{\text{OET}}}$ conté el monòmer derivat **11**, entre d'altres compostos. Fracció $\text{V}_{\text{V}^{\text{OET}}}$ conté el monòmer derivat **10**. Fracció $\text{VI}_{\text{V}^{\text{OET}}}$ presenta el derivat **12**. Columna, Vydac C18. Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Càrrega, 20 μL . Gradient 8% a 23% [D] en 45 min. Flux 1,5 mL/min.

4.4.2.3 Purificació per fase reversa i caracterització dels S-(O-etilcisteinil) derivats de flavanols

S'utilitzà la mateixa estratègia que en les fraccions obtingudes amb AQV-CYS (apartat 4.3.2.3).

4.4.2.3.1 Obtenció de 4β-[S-(O-etilcisteinil)]epicatequina (10)

La fracció $V_{V^{OET}}$ conté majoritàriament el producte **10**. S'evaporà el solvent i es carregà a la columna (2,3 L). La Taula 16 resumeix les condicions cromatogràfiques, on s'utilitzà la columna Vydac descrita a l'apartat 4.3.2.3.1. El seguiment analític es feu com en l'apartat 4.3.2.3.1 sota una elució isocràtica a 19%[D]. Abans de començar a carregar, les fraccions es diluïren amb aigua en proporció 1:1,5.

Taula 16. Condicions cromatogràfiques de purificació de **10** a partir de la fracció $V_{V^{OET}}$.

Càrrega	Eluents	Gradient	% [F] d'elució	Fracç. obtinguda
Fracció $V_{V^{OET}}$	[E]: TEAP2,25 [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 5%[F] 5 → 25%[F], 60min	8-9%[F] 10-16%[F]	s'ajuntà a $IV_{V^{OET}}$ TEAP1
TEAP1	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 2%[F] 2 → 22%[F], 30min	8-21%[F]	TFA2
TFA2 en 4 càrregues	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 0%[F] Isocràtic a 22%[F]	22%[F]	TFA3
TFA3	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 0%[F] Isocràtic a 22%[F]	22%[F]	TFA4

La fracció TFA4 es diluí i es carregà amb la mateixa elució isocràtica per tal d'anar enriquint-se amb el producte d'interès. Aquest procés es repetí 3 vegades fins obtenir la sal trifluoroacètica de 4β-[S-(O-etilcisteinil)]epicatequina **10** (354 mg). La puresa (95,9%) va ser quantificada per RP-HPLC en una columna μ RPC C2/C18, 3 μ m, i eluents [C]: 0.10%(v/v) TFA en H₂O i [D]: 0.09%(v/v) TFA en H₂O Milli-Q/CH₃CN (1:4), sota un gradient de 8% a 23% de [D] durant 45 min i un flux de 200 μ L/min amb detecció simultània a 214, 280 i 320 nm (Annex I.10).

Espectrometria de masses

Amb el mètode d'electrosprai positiu, s'obtingué un ió molecular de 438,1 (M+1)⁺, que correspon a la massa molecular del producte esperat calculada per C₂₀H₂₄N₁O₈S₁ (M+H)⁺ 438,1 g/mol (Annex I.11).

Ressonància magnètica nuclear

El producte purificat va ser sotmès a RMN-¹H (Annex I.11). Els desplaçaments químics obtinguts, fent servir TMS com a patró intern, van ser els següents:

RMN-¹H ((CD₃)₂CO + 3 gotes de D₂O, 300 MHz): δ 1,24 (3H, t, *J*=7,2Hz; O-CH₂-CH₃); 3,93 (1H, d, *J*=2,1Hz; 4-H configuració 3, 4-*trans*); 4,06 (1H, dd, *J*=2,4 i 0,9Hz; 3-H); 4,26 (2 H, q, *J*=7,2 i 1,5Hz; O-CH₂-CH₃); 4,71 (1H, m; S-CH₂-CH<); 5,09 (1H, s; 2-H configuració 2, 3-*cis*); 5,90 (1H, d, *J*=2,4Hz; 8-H); 6,09 (1H, d, *J*=2,4Hz; 6-H); 6,80-6,81 (2H, m; 5'-H, 6'-H); 7,04 (1H, d, *J*=1,8Hz; 2'-H).

4.4.2.3.2 *Obtenció de 4β-[S-(O-etilcisteinil)]catequina (11)*

La fracció IV^{vOET} conté majoritàriament el producte 11. S'evaporà el solvent i es carregà a la columna (2 L). La Taula 17 resumeix les condicions cromatogràfiques, on s'utilitzà la columna Vydac descrita a l'apartat 4.3.2.3.1. Per a l'obtenció de les fraccions TEAP5 i TFA6 s'emprà la columna Perkin-Elmer C18 25x2 cm. El seguiment analític es feu com en l'apartat 4.3.2.3.1 sota una elució isocràtica a 19%[D]. Abans de començar a carregar, les fraccions es diluïren amb aigua en proporció 1:1,5.

Taula 17. Condicions cromatogràfiques de purificació de 11 a partir de la fracció IV^{vOET}.

Càrrega	Eluents	Gradient	% [F] d'elució	Fracç. obtinguda
Fracció IV ^{vOET}	[E]: TEAP2,25 [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 2%[F] 2 → 22%[F], 60min	10-15%[F]	TEAP1
TEAP1	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 5%[F] 5 → 25%[F], 45min	13-19%[F]	TFA2
TFA2	[E]: TEAP2,25 [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 3%[F] 3 → 23%[F], 60min	11-15%[F]	TEAP3
TEAP3	[E]: TEAP5,62 [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 3%[F] 3 → 23%[F], 60min	14-17%[F]	TEAP4
TEAP4	[E]: TEAP2,25 [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 3%[F] 3 → 23%[F], 60min	20-23%[F]	TEAP5
TEAP5 en 7 càrregues	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 0%[F] Isocràtic 23%[F]	23%[F]	TFA6

La fracció TEAP5 es dividí en 7 alíquotes per a poder ser carregada en la columna Perkin-Elmer i obtenir una millor separació. La fracció TFA6 es diluí i es carregà amb el mateix isocràtic per tal d'anar enriquint-se amb el producte d'interès. Aquest procés es repetí 3 vegades fins obtenir la sal trifluoroacètica de 4 β -[S-(O-etilcisteinil)]catequina **11** (68 mg). La puresa (93,0%) va ser quantificada per RP-HPLC en el mateix sistema descrit pel compost **10** (Annex I.10).

Espectrometria de masses

Igual que l'anterior, s'obtingué un ió molecular de 438,1 (M+1)⁺, que correspon a la massa molecular del producte esperat calculada per C₂₀H₂₄N₁O₈S₁ (M+H)⁺ 438,1 g/mol (Annex I.12).

Ressonància magnètica nuclear

El producte purificat va ser sotmès a RMN-¹H (Annex I.12). Els desplaçaments químics obtinguts, fent servir TMS com a patró intern, van ser els següents:

RMN-¹H ((CD₃)₂CO + 3 gotes de D₂O, 300 MHz): δ 1,24 (3H, t, J=7,0Hz; O-CH₂-CH₃); 4,06 (1H, 2d, J=9,6 i 2,4Hz; 3-H configuració 2, 3-*trans*); 4,23 (1H, d, J=2,4Hz; 4-H configuració 3, 4-*cis*); 4,26 (2H, q, J=7,0 i 2,4Hz; O-CH₂-CH₃); 4,68-4,72 (1H, m; S-CH₂-CH<); 4,78 (1H, d, J=8,6Hz; 2-H); 5,89 (1H, d, J=2,4Hz; 8-H); 6,10 (1H, d, J=2,4Hz; 6-H); 6,62 (2H, m; 5'-H, 6'-H); 6,91 (1H, s; 2'-H).

4.4.2.3.3 *Obtenció de 4 β -[S-(O-etilcisteinil)]epicatequin 3-O-galat (**12**)*

La fracció VI_v^{OET} conté majoritàriament el producte **12**, pel que s'evaporà el solvent i així poder ser carregada a la columna (1 L). La Taula 18 resumeix les condicions cromatogràfiques, on s'utilitzà la columna Vydac descrita a l'apartat 4.3.2.3.1. Per l'obtenció de la fracció TFA4 es va emprar la columna Perkin-Elmer C18 25x2 cm. El seguiment analític es feu com en l'apartat 4.3.2.3.1 sota una elució isocràtica a 21%[D]. Abans de començar a carregar, les fraccions es diluïren amb aigua en proporció 1:1,5.

Taula 18. Condicions cromatogràfiques de purificació de **12** a partir de la fracció **VI_V^{OET}**.

Càrrega	Eluents	Gradient	% [F] d'elució	Fracc. obtinguda
Fracció VI_V^{OET}	[E]: TEAP2,25 [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 10%[F] 10 → 30%[F], 60min	19-20%[F]	TEAP1
TEAP1	[E]: TEAP5,62 [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 10%[F] 10 → 30%[F], 60min	24-28%[F]	TEAP2
TEAP2	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega 12%[F] 12 → 32%[F], 30min	27-30%[F]	TFA3
TFA3	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega 20%[F] 20 → 40%[F], 30min	34-37%[F]	TFA4

La fracció TFA4 es va liofilitzar per obtenir la 4β-[S-(O-etilcisteinil)]epicatequin 3-O-galat **12** (33 mg) com a sal trifluoroacètica. La puresa (96,5%) va ser quantificada per RP-HPLC en el mateix sistema descrit pel compost **10** (Annex I.10).

Espectrometria de masses

De la mateixa manera, s'obtingué un ió molecular de 590,1 (M+1)⁺, que correspon a la massa molecular del producte esperat calculada per C₂₇H₂₈N₁O₁₂S₁ (M+H)⁺ 590,1 g/mol (Annex I.13).

Ressonància magnètica nuclear

El producte purificat va ser sotmès a RMN-¹H (Annex I.13). Els desplaçaments químics obtinguts, fent servir TMS com a patró intern, van ser els següents:

RMN-¹H ((CD₃)₂CO + 3 gotes de D₂O, 300MHz): δ 1,28 (3H, t, J=7,0Hz; O-CH₂-CH₃); 4,15 (1H, d, J=1,8Hz; 4-H configuració 3, 4-*trans*); 4,29 (2H, q, J=7,0 i 1,8Hz; O-CH₂-CH₃); 4,77 (1H, m; S-CH₂-CH₂); 5,28 (1H, m; 3-H); 5,36 (1H, bs; 2-H configuració 2, 3-*cis*); 6,01 (1H, d, J=2,1Hz; 6-H); 6,13 (1H, d, J=2,1Hz; 8-H); 6,79 (1H, d, J=8,1Hz; 5'-H); 6,88 (1H, dd, J=8,4 i 2,1Hz; 6'-H); 6,96 (2H, s; H del galoil); 7,10 (1H, d, J=1,8Hz; 2'-H).

4.5 SÍNTESIS, SEPARACIÓ I PURIFICACIÓ DELS S-(N-ACETIL-O-METILCISTEINIL) DERIVATS DE FLAVANOLS A ESCALA DE GRAMS

4.5.1 Preparació del cru contenint S-(N-acetil-O-metilcisteinil) derivats de flavanols

El cru de *Vitis vinifera* (AQV) es preparà d'idèntica manera a la descrita amb la cisteïna (apartat 4.3.1.1) tot emprant la N-acetil-L-cisteïna. Es seguí el procés descrit a l'apartat 3.3.2.1.3 i el cru resultant s'anomenà AQV-NAmC (4 L, ~1,5-2 g/L de polifenols amb NAC; Figura 28). Els derivats obtinguts no foren els conjugats amb N-acetil-L-cisteïna (àcid lliure) sinó els seus esters metílics. El grup amida en l'aminoàcid activa el grup carboxílic que ha estat esterificat pel metanol present com a solvent sota condicions àcides i alta temperatura.

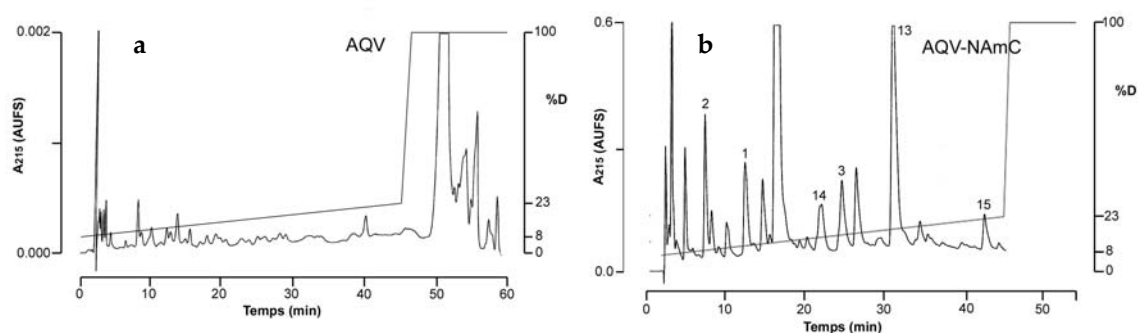


Figura 28. Perfils de cromatografia en fase reversa corresponent al procés de despolimerització en medi àcid. (a) Fracció AQV. (b) Cru tractat amb N-acetil-L-cisteïna (AQV-NAmC). Columna, Vydac C18. Càrrega AQV, 25 µL (~37 µg de polifenols). Càrrega AQV-NAmC, 20 µL (6 µg de polifenols). Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Gradient de 8% a 23% [D] en 45 min. Flux 1,5 mL/min.

4.5.2 Separació i purificació dels S-(N-acetil-O-metilcisteinil) derivats de flavanols a partir de *Vitis vinifera*

4.5.2.1 Separació per bescanvi aniònic

L'esterificació fou observada al obtenir una massa de 15 g/mol per sobre de l'esperada un cop purificat els derivats i, simultàniament, per una senyal singlet en RMN característica del O-metil. Fins aleshores es treballà pensant en uns derivats amb càrrega negativa. És per això que s'emprà el bescanvi aniònic per la separació dels derivats de la resta del cru.

Com en els derivats de CYS i OET, les condicions trobades a l'apartat 4.2 es van escalar unes 20 vegades (càrrega de 500 mL de cru AQV-NAmC, ~1.000 mg de flavanols) per una columna de 105 mL de VC empaquetada ara amb una reïna de bescanvi aniònic Macro Prep

High Q. S'equilibrà durant 9 VC amb tampó acetat sòdic 20 mM, pH 4,75/EtOH (9:1) on un pH no tan àcid com en els anteriors casos afavoriria la interacció de la càrrega negativa.

Per a cada alíquota de AQV-NAmC a carregar (vuit en total) es van seguir les condicions d'elució trobades en l'escala de mil·ligrams.

Després de cada càrrega es feu un rentat amb la solució d'equilibrat (4 VC) per tal d'eliminar els compostos que no quedin retinguts a la columna. Seguidament es recollí una fracció $I_{V^{NAC}}$ eluïda amb tampó acetat sòdic 20 mM, pH 4,75/EtOH (7:3) durant 7 VC i contenint els derivats **13** i **14**. La fracció $II_{V^{NAC}}$ s'eluí amb tampó acetat sòdic 20 mM, pH 4,75/EtOH (3:2) durant 5 VC, on encara aparegueren els compostos **13** i **14** junt amb el seu corresponent galat **15**. Sorprenentment s'observà la presència dels monòmers **1** i **2** en els últims volums de columna d'aquesta fracció (Figura 29). La fracció $III_{V^{NAC}}$ s'eluí amb tampó acetat sòdic 20 mM, pH 4,75/EtOH (3:2), 1 M clorur sòdic (7 VC), recollint-se els monòmers **1-3**.

Les fraccions que s'anaren generant s'analitzaren per fase reversa amb la columna Vydac C18 (apartat 3.3.5.1) sota un gradient de 8% a 23% [D] en 45 min (Figura 29).

Contràriament al bescanvi catiònic, els compostos sense derivar (**1-3**) es quedaren fortament retinguts en la reïna, mentre els corresponents derivats eren poc retinguts per la columna. La separació entre els derivats **13-15** i els monòmers **1-3** fou efectiva amb l'avantatge afegit

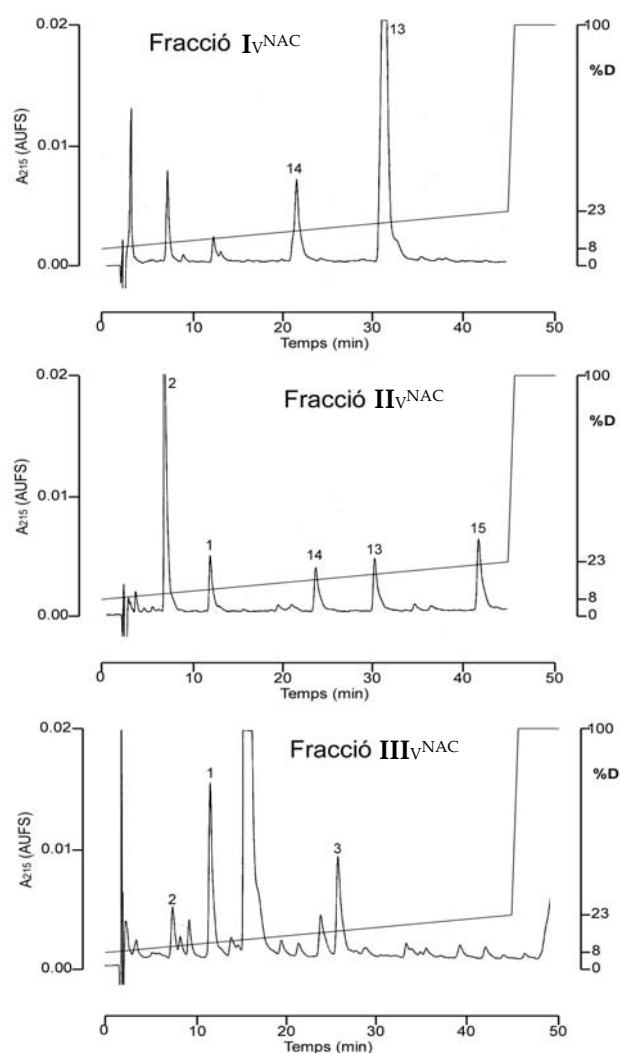


Figura 29. Perfils de cromatografia en fase reversa. La Fracció $I_{V^{NAC}}$ conté els monòmers derivats **13** i **14**. La Fracció $II_{V^{NAC}}$ conté els derivats **13-15**, juntament amb **1** i **2**. La Fracció $III_{V^{NAC}}$ conté els no derivats. Columna, Vydac C18. Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Càrrega, 20 μ L. Gradient 8% a 23% [D] en 45 min. Flux, 1.5 mL/min.

que els productes d'interès s'obtingueren amb menys quantitat d'eluent i sense necessitat de NaCl. Aquest resultat portà a un estudi posterior per saber si els altres compostos derivats amb OET i CYS podrien ser separats dels monòmers de la mateixa manera (veure apartat 4.7).

4.5.2.2 Separació per fase reversa

La fracció $I_{V^{NAC}}$ (5 L, contenint els derivats **13** i **14**) obtinguda del bescanvi aniónic del cru AQV-NAmC, se li evaporà el solvent i la solució resultant (2 L) es carregà en un HPLC de fase reversa amb columna Vydac C18 (apartat 3.3.5.2). Es feren tres càrregues de 0,7 L, eluint-se sota un gradient de 5% a 25% de [D] durant 45 min. Es van obtenir dues fraccions enriquides en cadascun dels compostos: Fracció $IV_{V^{NAC}}$ (2 L, 12% de CH_3CN) i fracció $V_{V^{NAC}}$ (3,4 L, 15% de CH_3CN ; Figura 30). Aquestes fraccions van ser utilitzades per purificar cadascun dels compostos conjugats **13** i **14** emprant cromatografia en fase reversa a escala preparativa.

Per una altra banda, la fracció $II_{V^{NAC}}$ (3,5 L) contenia la totalitat del compost **15**, trobant-se força separat de la resta de productes, pel que s'emprà directament per a la seva purificació.

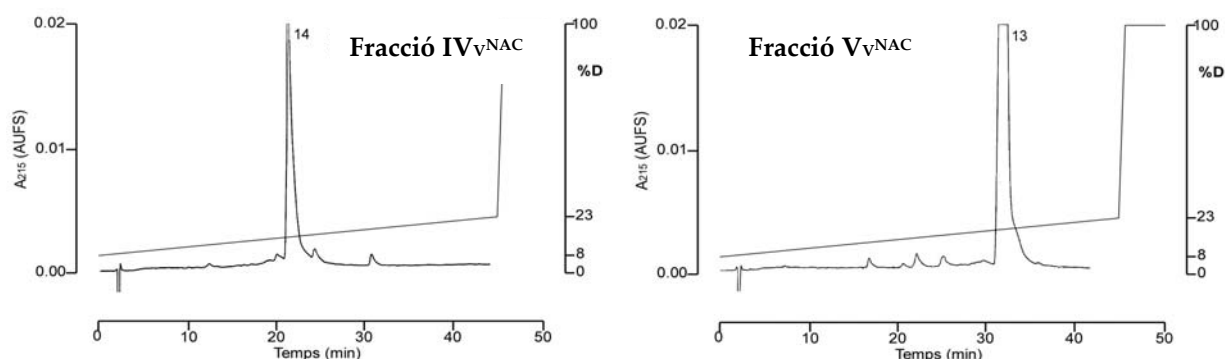


Figura 30. Perfils de cromatografia en fase reversa. Fracció $IV_{V^{NAC}}$, enriquida amb el compost **14**. Fracció $V_{V^{NAC}}$, enriquida amb el compost **13**. Columna, Vydac C18. Càrrega, 100 μ L. Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Gradient de 8% a 23% [D] en 45 min. Flux 1,5 mL/min.

4.5.2.3 Purificació per fase reversa i caracterització dels S-(N-acetil-O-metilcisteinil) derivats de flavanols

S'utilitzà la mateixa estratègia que en les fraccions obtingudes amb AQV-CYS (apartat 4.3.2.3).

4.5.2.3.1 Obtenció de 4β-[S-(N-acetil-O-metilcisteinil)]epicatequina (13)

La fracció $V_{V^{NAC}}$ conté majoritàriament el producte **13**. S'evaporà el solvent i es carregà a la columna (1,5 L). La Taula 19 resumeix les condicions cromatogràfiques, on s'utilitzà la columna Vydac descrita a l'apartat 4.3.2.3.1. El seguiment analític es feu com en l'apartat 4.3.2.3.1 sota una elució isocràtica a 17%[D]. Abans de començar a carregar, les fraccions es diluïren amb aigua en proporció 1:1,5.

Taula 19. Condicions cromatogràfiques de purificació de **13** a partir de la fracció $V_{V^{NAC}}$.

Càrrega	Eluents	Gradient	% [F] d'elució	Fracc. obtinguda
Fracció $V_{V^{NAC}}$	[E]: TEAP2,32 [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 7%[F] 7 → 27%[F], 60min	14%[F] 15-21%[F]	s'ajuntà a $IV_{V^{NAC}}$ TEAP1
TEAP1	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 8%[F] 8 → 28%[F], 20min	24-28%[F]	TFA2
TFA2	[E]: TEAP5,66 [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 7%[F] 7 → 27%[F], 60min	17-21%[F]	TEAP3
TEAP3	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 0%[F] Isocràtic a 40%[F]	40%[F]	TFA4

La fracció TFA4 es liofilitzà obtenint-se el 4β-[S-(N-acetil-O-metilcisteinil)]epicatequina **13** (818 mg). La puresa (99,4%) va ser quantificada per RP-HPLC en una columna μ RPC C2/C18, 3 μ m, i eluents [C]: 0,10%(v/v) TFA en H₂O Milli-Q i [D]: 0,09%(v/v) TFA en H₂O Milli-Q/CH₃CN (1:4), sota un gradient de 8% a 23% de [D] durant 45 min i un flux de 200 μ L/min amb detecció simultània a 214, 280 i 320 nm (Annex I.14).

Espectrometria de masses

Amb el mètode d'electrosprai negatiu, s'obtingué un ió molecular de 464,7 (M-1)⁻, que correspon a la massa del producte esterificat calculat per C₂₁H₂₃N₁O₉S₁ (M-H)⁻ 464,5 g/mol (Annex I.15).

Ressonància magnètica nuclear

El producte purificat va ser sotmès a RMN-¹H (Annex I.15). Els desplaçaments químics obtinguts, fent servir TMS com a patró intern, van ser els següents:

RMN-¹H ((CD₃)₂CO + 3 gotes de D₂O, 300 MHz): δ 2,05 (3H, s; CO-CH₃); 3,69 (3H, s; O-CH₃); 4,02 (1H, dd, *J*=2,4 i 1,2Hz; 3-H configuració 2, 3-*cis*); 4,06 (1H, d, *J*=2,4Hz; 4-H configuració 3, 4-*trans*); 4,94 (1H, m; S-CH₂-CH<); 5,22 (1H, s; 2-H); 5,89 (1H, d, *J*=2,4Hz; 8-H); 6,06 (1H, d, *J*=2,4Hz; 6-H); 6,81-6,83 (2H, m; 5'-H, 6'-H); 7,06 (1H, d; *J*=2,1Hz; 2'-H).

4.5.2.3.2 *Obtenció de 4β-[S-(N-acetil-O-metilcisteinil)]catequina (14)*

La fracció IV_V^{NAC} conté majoritàriament el producte **14**. S'evaporà el solvent i es carregà a la columna (1,5 L). La Taula 20 resumeix les condicions cromatogràfiques, on s'utilitzà la columna Vydac descrita a l'apartat 4.3.2.3.1. Per l'obtenció de les fraccions TEAP3 i TFA4 es va emprar la columna Perkin-Elmer C18 25x2 cm. El seguiment analític es feu com en l'apartat 4.3.2.3.1 sota una elució isocràtica a 17%[D]. Abans de començar a carregar, les fraccions es diluïren amb aigua en proporció 1:1,5.

Taula 20. Condicions cromatogràfiques de purificació de **14** a partir de la fracció IV_V^{NAC}.

Càrrega	Eluents	Gradient	% [F] d'elució	Fracc. obtinguda
Fracció IV _V ^{NAC}	[E]: TEAP2,45 [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 7%[F] 7 → 27%[F], 60min	19-20%[F]	TEAP1
TEAP1	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 7%[F] 7 → 27%[F], 20min	25-17%[F]	TFA2
TFA2	[E]: TEAP4,90 [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 7%[F] 7 → 27%[F], 60min	16-20%[F]	TEAP3
TEAP3 (en 2 càrregues)	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 8%[F] 15 → 35%[F], 45min	14-28%[F]	TFA4
TFA4 (en 3 càrregues)	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 0%[F] Isocràtic 20%[F]	23%[F]	TFA5

La fracció TEAP3 es dividí en 2 alíquotes per poder ser carregada en la columna Perkin-Elmer i obtenir una millor separació. La fracció TFA4 es dividí en 3 càrregues pel mateix motiu. La fracció resultant TFA5 es diluí i es carregà amb la mateixa elució isocràtica per tal d'anar enriquint-se amb el producte d'interès. Aquest procés es repetí 3 vegades fins obtenir el compost 4 β -[S-(N-acetil-O-metilcisteinil)]catequina **14** (112 mg). La puresa (98,0%) va ser quantificada per RP-HPLC en el mateix sistema descrit pel compost **13** (Annex I.14).

Espectrometria de masses

Igual que l'anterior, s'obtingué un ió molecular de 464,9 (M-1)⁻, que correspon a la massa molecular del producte esterificat calculada per C₂₁H₂₃N₁O₉S₁ (M-H)⁻ 464,5 g/mol (Annex I.16).

Ressonància magnètica nuclear

El producte purificat va ser sotmès a RMN-¹H (Annex I.16). Els desplaçaments químics obtinguts, fent servir TMS com a patró intern, van ser els següents:

RMN-¹H ((CD₃)₂CO + 3 gotes de D₂O, 300 MHz): δ 2,11 (3H, s; CO-CH₃); 3,65 (3H, s; O-CH₃); 4,15 (1 H, 2d, J=9,6 i 3,9Hz; 3-H); 4,38 (1H, d, J=3,9Hz; 4-H configuració 3, 4-*cis*); 4,82 (1H, m; S-CH₂-CH<); 4,95 (1H, d, J=9,6Hz; 2-H configuració 2, 3-*trans*); 5,78 (1H, d, J=2,4Hz; 8-H); 6,06 (1H, d, J=2,4Hz; 6-H); 6,78 (2H, m; 5'-H, 6'-H); 6,92 (1H, s; 2'-H).

4.5.2.3.3 Obtenció de 4β-[S-(N-acetil-O-metilcisteinil)]epicatequin 3-O-galat (**15**)

La fracció **II_V^{NAC}** conté la totalitat del producte **15**. S'evaporà el solvent i es carregà a la columna (1,8 L). La Taula 21 resumeix les condicions cromatogràfiques, on s'utilitzà la columna Vydac descrita a l'apartat 4.3.2.3.1. Per l'obtenció de la fracció TFA3 es va emprar la columna Perkin-Elmer C18 25x2 cm. El seguiment analític es feu com en l'apartat 4.3.2.3.1 sota una elució isocràtica a 22%[D]. Les fraccions es diluïren amb aigua en proporció 1:1,5.

Taula 21. Condicions cromatogràfiques de purificació de **15** a partir de la fracció **II_V^{NAC}**.

Càrrega	Eluents	Gradient	% [F] d'elució	Fracc. obtinguda
Fracció II_V^{NAC}	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega 12%[F] 15 → 35%[F], 30min	28-34%[F]	TFA1
TFA1	[E]: TEAP5,0 [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 20%[F] 20 → 40%[F], 60min	30-36%[F]	TEAP2
TEAP2	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega 20%[F] 20 → 40%[F], 40min	34-39%[F]	TFA3
TFA3	[E]: TFA 0,1% [F]: [E]/CH ₃ CN (1:4)	Càrrega a 0%[F] Isocràtic 28%[F]	28%[F]	TFA4

La fracció TFA3 es dividí en tres alíquotes per poder ser carregada en la columna Perkin-Elmer. La fracció TFA4 es diluí i es dividí en 3 càrregues pel mateix motiu. D'aquesta manera s'enriquí amb el producte d'interès repetint el procés dues vegades fins obtenir el compost 4β-[S-(N-acetil-O-metilcisteinil)]epicatequin 3-O-galat **15** (88 mg). La puresa (95,1%) va ser quantificada per RP-HPLC en el mateix sistema descrit pel compost **13** (Annex I.14).

Espectrometria de masses

De la mateixa manera, s'obtingué un ió molecular de 616,3 (M-1)⁻, que correspon a la massa molecular del producte esterificat calculada per C₂₈H₂₇N₁O₁₃S₁ (M-H)⁻ 616,6 g/mol (Annex I.17).

Ressonància magnètica nuclear

El producte purificat va ser sotmès a RMN-¹H (Annex I.17). Els desplaçaments químics obtinguts, fent servir TMS com a patró intern, van ser els següents:

RMN-¹H ((CD₃)₂CO + 3 gotes de D₂O, 300MHz): δ 2,09 (3H, s; CO-CH₃); 3,71 (3H, s; O-CH₃); 4,26 (1H, d, J=2,4Hz; 4-H configuració 3, 4-*trans*); 5,01 (1H, m; S-CH₂-CH<); 5,21 (1H, m; 3-H); 5,48 (1H, bs; 2-H); 6,01 (1H, d, J=2,4Hz; 8-H); 6,07 (1H, d, J=2,4Hz; 6-H); 6,78 (1H, d, J=8,1Hz; 5'-H); 6,89 (1H, dd, J=8,1 i 2,1Hz; 6'-H); 6,96 (2H, s; H del galoi); 7,08 (1H, d, J=2,1Hz; 2'-H).

4.6 OBTENCIÓ DEL S-(N-ACETILCISTEINIL) DERIVAT PER HIDRÒLISI ENZIMÀTICA DE L'ÈSTER CARBOXÍLIC

4.6.1 Reacció d'hidròlisi amb papaïna

La hidròlisi de **13** es feu en medi aquós i *via* enzimàtica. Per a l'estudi es provà amb l'enzim papaïna, una cisteïna proteasa capaç de trencar enllaços peptídics i d'hidrolitzar èsters. El seu pH òptim es troba entre 6,0 i 7,0. La hidròlisi es realitzà en medi tamponat aquós i en presència de DTT, emprat tant com activador com antioxidant, degut a que l'enzim papaïna és sensible als oxidants.

Es realitzà una prova a escala de 5 mg, i la reacció es va duu a terme segons el descrit a l'apartat 3.3.7. Per a poder analitzar la cinètica de la reacció, s'agafaren alíquotes a diferents temps de reacció, es diluïren (1/5) amb aigua Milli-Q amb 0,1% de TFA i es congelaren a -20°C. S'analitzaren per HPLC en fase reversa (columna Vydac C18, apartat 3.3.5.1) eluint-se amb un gradient de 10% a 30%[D] en 25 min. A 30 min la reacció havia avançat amb un 35% de conversió cap al nou pic A. La reacció es donà per finalitzada a les 27 h amb una conversió quantitativa del producte **13** (Figura 31).

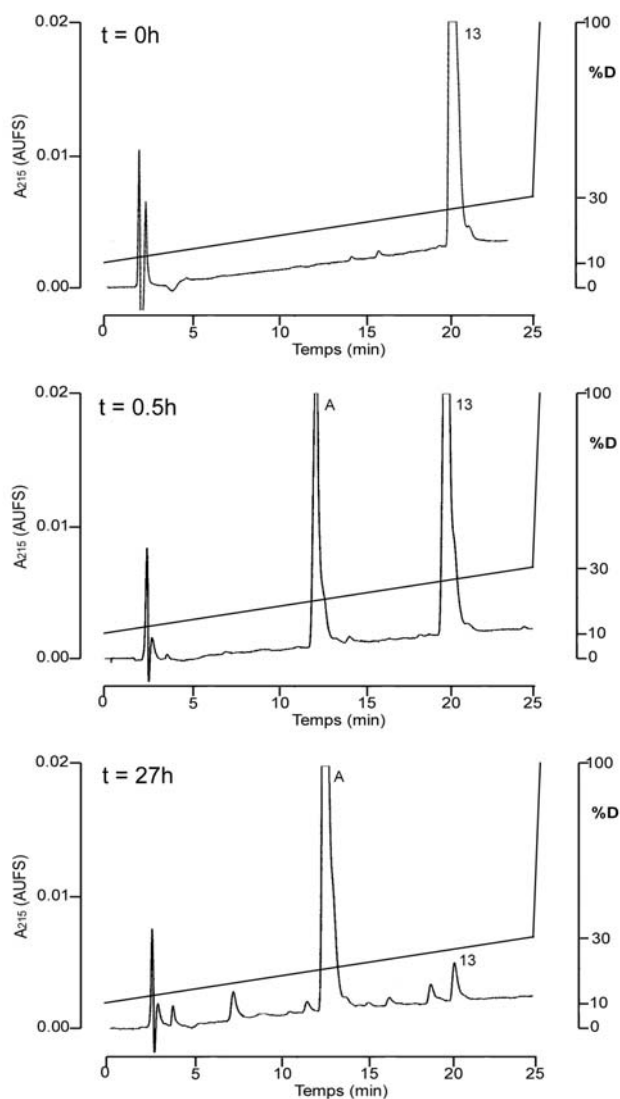


Figura 31. Perfils de la hidròlisi enzimàtica en fase reversa. A temps 0 h de la reacció s'observà només el compost esterificat **13** i a mesura que avança en el temps es convertí en el pic A mentre el compost **13** es consumia. Columna, Vydac C18. Càrrega, 20 µL. Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Gradient de 10% a 30% [D] en 25 min. Flux 1,5 mL/min.

El següent pas fou escalar la reacció d'hidròlisi 10 vegades, fent reaccionar el producte **13** (50 mg, 12 mM) amb una solució aquosa tamponada a pH 6,6 (9,5 mL) contenint papaïna (12,2 mg, 58 μ M) i DTT (0,5 mL) sota atmosfera d'argó i agitació a 25°C durant 24 h. La reacció avançà com l'anterior, i a 24 h s'hi adicionà TFA (0,5 mL) i es reservà a 4°C fins al següent pas de purificació del producte obtingut.

4.6.2 Separació i purificació per fase reversa

La solució resultant de la hidròlisi, un cop acidificada amb TFA, es centrifugà per eliminar les parts insolubles i la resta es carregà en la columna C18 Perkin-Elmer (apartat 3.3.5.2) on [E] fou aigua destil·lada amb 0,1%TFA i [F] fou [E]/CH₃CN (1:4). La columna s'equilibrà amb [E] i, després de la càrrega, s'eluí amb un gradient de 10% a 30%[F] en 25 min i s'analitzà a 254 nm. El pic majoritari eluí a 28% de [F] i, un cop liofilitzat, s'obtingué la sal trifluoroacètica de 4 β -[S-(N-acetilcisteinil)]epicatequina (35,8 mg). La puresa (98,5%) va ser quantificada per RP-HPLC en el mateix sistema descrit pel compost **13** (Annex I.18).

Espectrometria de masses

L'electrosprai negatiu donà un ió molecular de 450,6 (M-1)⁻, que correspon a la massa molecular del conjugat hidrolitzat calculada per C₂₀H₂₀N₁O₉S₁ (M-1)⁻ 450,4 g/mol (Annex I.18).

Ressonància magnètica nuclear

El producte purificat va ser sotmès a RMN-¹H (Annex I.18). Els desplaçaments químics obtinguts, fent servir TMS com a patró intern, van ser els següents:

RMN-¹H ((CD₃)₂CO + 3 gotes de D₂O, 300MHz): δ 2,00 (3H, s; CO-CH₃); 4,09 (1H, bs; 4-H); 4,14 (1H, bs; 3-H); 4,96 (1H, m; S-CH₂-CH<); 5,29 (1H, s; 2-H); 5,93 (1H, d, J=2,4Hz; 8-H); 6,08 (1H, d, J=2,4Hz; 6-H); 6,82 (1H, d, J=8,1Hz; 5'-H); 6,88 (1H, dd, J=8,1 i 1,6Hz; 6'-H); 7,10 (1H, d, J=2,0Hz; 2'-H). On *bs* és un senyal ample.

Anàlisi elemental

Es realitzà un anàlisi elemental dels àtoms de C, H, N i S. El resultat experimental fou 45,5% d'àtoms de C; 4,7% de H; 2,7% de N i 5,5% de S. L'anàlisi elemental teòric es realitzà amb un equivalent de TFA i un altre d'aigua (degut a que es tracta d'una sal de TFA), sent 45,3%C; 4,2%H; 2,4%N i 5,5%S. L'interval de confiança per aquest anàlisi es troba en un \pm 0,3%.

4.7 SEPARACIÓ PER BESCANVI ANIÒNIC DELS DERIVATS CYS, OET I NAmC A ESCALA DE MIL·LIGRAMS

En la separació dels NAmC-derivats per bescanvi aniònic (apartat 4.5.2.1), s'observà que els conjugats s'elüïren amb poc solvent mentre que els monòmers no derivats presentaren una forta retenció en la reïna. Això va sorprendre degut a que els monòmers de flavanols no són aniònics al pH de treball. Es va estudiar aquest fenomen per la seva utilitat pràctica donat que la separació amb el bescanviador aniònic permetria obtenir una fracció amb els productes d'interès no retinguts emprant menys quantitat de solvent i sense necessitat de clorur sòdic (NaCl), fet que podria ajudar a que la separació fos més neta de les impureses tant monomèriques com polimèriques que també es retenien en la reïna.

Es va estudiar el comportament cromatogràfic dels conjugats de CYS (amfòters), els de OET (càrrega neta positiva) i els de NAmC (neutres, com els no-derivats).

Així es partí dels crus de OW-CYS, OW-OET i OW-NAmC obtinguts en l'apartat 4.2. La reïna Macro Prep High Q, de 6 mL VC, s'equilibrà amb tampó acetat sòdic 20 mM, pH 4,75/EtOH (9:1) i es carregà amb els crus de OW diluïts 1/8 amb 0,1% TFA (10 mL, 5 mg). Seguidament es feren tres isocràtics tot recollint una fracció per a cadascun d'ells. El primer isocràtic fou amb tampó acetat sòdic 20 mM, pH 4,75/EtOH (9:1), el segon amb tampó acetat sòdic 20 mM, pH 4,75/EtOH (7:3) i l'últim amb tampó acetat sòdic 20 mM, pH 4,75/EtOH (3:2). Les fraccions foren analitzades per fase reversa mitjançant una columna μ RPC (apartat 3.3.5.1) eluïts amb gradients de 8% a 23%[D] per OW-CYS, de 10% a 25%[D] per OW-OET i de 12% a 27%[D] per OW-NAmC.

La separació del cru OW-NAmC mostrà la mateixa tendència que s'observà anteriorment. Així, en tampó acetat/EtOH (7:3) s'elüïren els conjugats **13** i **14** (Fracció $\text{II}_{\text{v}}^{\text{NAC}}$, Figura 32) i, ja al final de l'elució, començaren a aparèixer els monòmers **1** i **2**, segurament degut a l'efecte del parell iònic ja descrit en l'apartat 4.1.2. Al canviar a tampó acetat/EtOH (3:2) elüïren els monòmers **1-3** junt amb el conjugat galat **15** (fracció $\text{III}_{\text{v}}^{\text{NAC}}$, Figura 32).

Un efecte molt més pronunciat d'aquesta separació entre conjugats i monòmers es va observar amb la separació del cru OW-OET. Al tractar-se de conjugats amb càrrega neta positiva, els compostos **10-12** ja s'elüïren amb tampó acetat/EtOH (9:1) (Fracció $\text{I}_{\text{v}}^{\text{OET}}$, Figura 32). Els no derivats **1** i **2** elüïren en tampó acetat/EtOH (3:2) (Fracció $\text{III}_{\text{v}}^{\text{OET}}$, Figura 32).

El cru de OW-CYS es comportà de diferent manera, eluint tant els conjugats **7-9** com els monòmers **1-3** en tampó acetat/EtOH (7:3) (Fracció **II_V^{CYS}**, Figura 32). Tots els productes van acabar d'eluir amb el tampó acetat/EtOH (3:2) (fracció **III_V^{CYS}**, Figura 32).

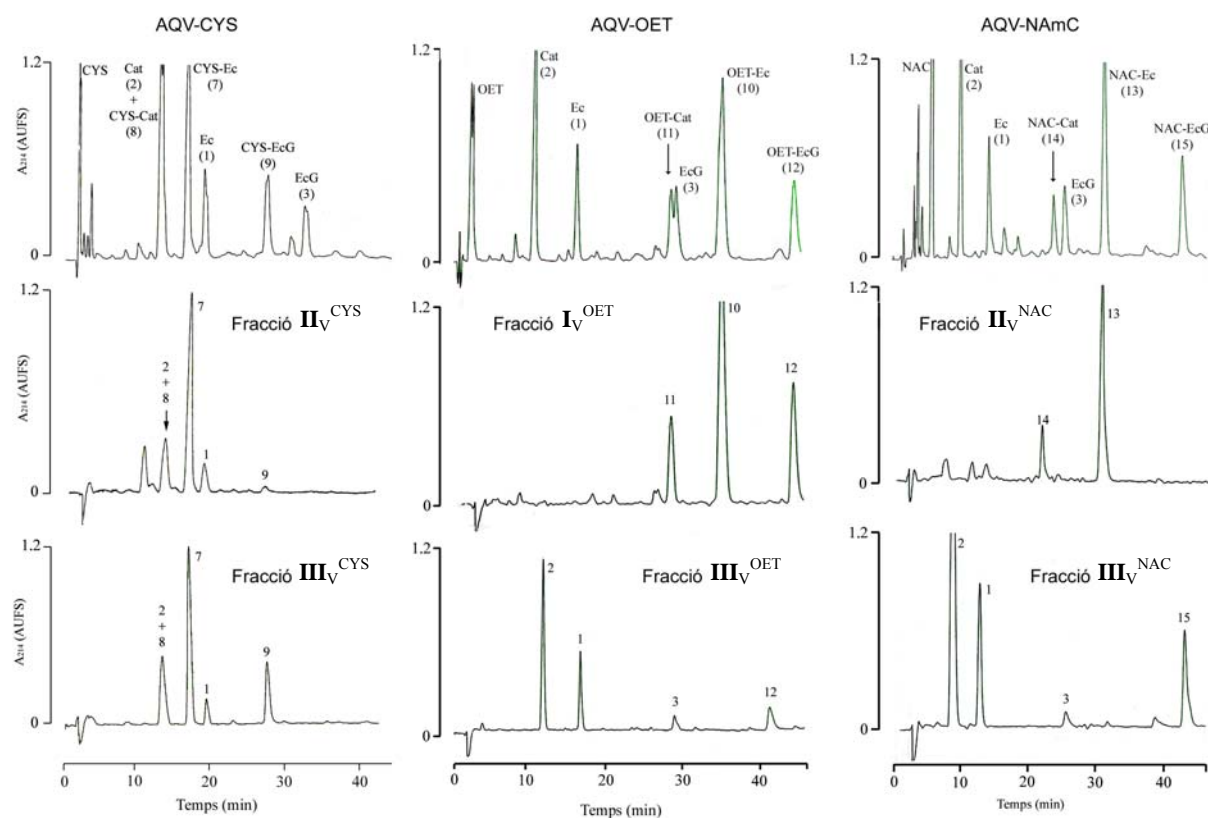


Figura 32. Perfils de cromatografia en fase reversa on es mostren els diferents crus de reacció AQV-CYS, AQV-OET i AQV-NAmC i la separació per columna d'intercanvi aniónic dels compostos derivats en les fraccions inicials (**I** i **II**) mentre els monòmers queden retinuts. Columna, μ RPC. Càrrega, 10 μ L (12 μ g) en els crus i 100 μ L en les fraccions. Elució descrita a l'apartat 3.3.5.1. Gradient de 8% a 23%[D] per OW-CYS, 10% a 25%[D] per OW-OET i 12% a 27%[D] per OW-NAmC. Flux 200 μ L/min.

La sorprenentment eficient separació per bescanvi aniónic dels conjugats de *N*-acetil-L-cisteïna (NAmC) i dels èsters etílics de cisteïna (OET) del cru despolimeritzat podria dependre de diversos factors. En el pH de treball, els monòmers sense derivar i els conjugats de NAmC no presentaren cap càrrega neta en la molècula mentre els conjugats de CYS presentaren una naturalesa amfòtera i els conjugats de OET presentaren una càrrega neta positiva. Per tant, *a priori* cap dels compostos presentaria una interacció iònica amb l'amoni quaternari de la reïna. Així, si cap altre interacció tret de l'electrostàtica hagués tingut lloc, els compostos derivats i els monòmers juntament amb la resta de material sense càrrega haurien d'haver-se eluït amb el tampó acetat de rentat. En la realitat, quan s'elueixen amb el tampó de rentat (sense presència de solvents orgànics) totes les molècules foren retingudes per la reïna. Tal

com s'ha comentat abans (apartat 4.1.2), una quantitat mínima de co-solvent orgànic és necessària per disminuir o eliminar les interaccions hidrofòbiques. Aquesta interacció hidrofòbica fou la majoritària en els derivats de OET i NAmC, els quals van necessitar almenys un 15% d'etanol per començar a ser eluïts de la reïna, mentre la resta de compostos flavanolics es quedaren encara retinguts en el suport. Els compostos monomèrics, així com els derivats de CYS i d'altre material polifenòlic, foren inesperadament retinguts pel suport catiònic, necessitant una gran quantitat de co-solvent orgànic (tampó acetat/EtOH (3:2)) per ser eluïts. La natura d'aquesta interacció tan forta entre els flavan-3-ols i l'amoni quaternari estaria més propera a una interacció iònica que a una d'hidrofòbica.

L'observació d'aquesta forta interacció entre els monòmers i la reïna High Q (que conté un grup amoni quaternari) i no amb la High S (que conté un grup sulfònic), va fer pensar que l'amoni quaternari podria jugar un cert paper en la interacció. Interaccions no covalents clàssiques com ara les iòniques, ponts d'hidrogen, forces de Van der Waals i interaccions hidrofòbiques quedaren descartades per no presentar càrrega o per ser *a priori* massa dèbils per aconseguir retenir els monòmers en la reïna després d'una elució amb solvent orgànic (tampó/EtOH (7:3)). Altres interaccions no covalents han cobrat importància en les últimes dècades, referides a atraccions del tipus aromàtic/aromàtic (Serrano *et al.*, 1991), càrrega/dipol (Coen *et al.*, 1995) i catió- π (Dougherty, 1996; Fernandez-Recio *et al.*, 1999), de les quals depenen en força mesura la funcionalitat i l'estabilització d'estructures biològiques. Centrant-nos en la interacció catió- π , aquesta cobra importància en l'estructura tridimensional de proteïnes, on aminoàcids amb grups catiònics com lisina (Lys) i arginina (Arg) interaccionen amb cadenes aromàtiques com ara fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) o triptòfan (Trp). Estudis teòrics i experimentals han demostrat que les interaccions catió- π tenen una energia semblant o més elevada que els ponts d'hidrogen, tant en fase gas com en medis aquosos (Zhong *et al.*, 1998). En els sistemes biològics, el sistema π és generat pels tres aminoàcids que contenen l'anell aromàtic en la cadena lateral (Phe, Tyr i Trp) mentre que els cations que hi poden participar cobreixen un ampli rang, des de ions inorgànics simples (com Li^+ , Na^+ i K^+) fins amines protonades (RNH_3^+), amonis quaternaris, sulfònics i carbocations, entre d'altres. Estudis fets en fase gas han demostrat que la magnitud de l'interacció és fortament dependent de la natura del ió. Així, ions petits com Li^+ i Na^+ presenten les més elevades entalpies d'unió, al voltant de 30 kcal/mol, i cations més complexos com NH_4^+ i $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ encara mostren entalpies força elevades (al voltant de 14

kcal/mol) (Dougherty, 1996). En sistemes aquosos la tendència s'inverteix fins al punt en que els cations petits presenten una energia de solvatació massa elevada per a trencar-la i formar una interacció catió- π . En canvi, amb cations voluminosos com ara l'amoni quaternari si que es podrien generar interaccions catió- π en medis aquosos. Aquesta força d'unió podria explicar la forta retenció a la reïna observada en els monòmers, els quals presenten anells benzènics. El benzè es considera com una molècula apolar perquè no presenta moment dipolar permanent. Tot i així, té un moment quadrupolar (dos moments dipolars alineats en l'espai de tal manera que es neutralitzen) que li confereixen una distribució de càrrega permanent capaç d'interaccionar amb d'altres càrregues positives a través de forces electrostàtiques (veure Figura 33).

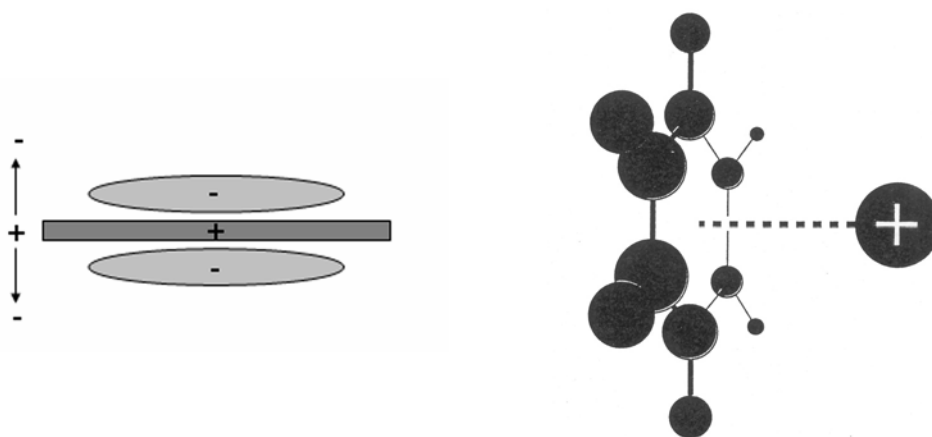


Figura 33. Representació del moment quadrupolar del benzè i de la interacció catió- π , on es mostra una càrrega positiva genèrica interaccionant amb el benzè (Dougherty, 1996)

Aquests mateixos sistemes benzènics també es troben en els compostos derivats, els quals no presenten tal força d'interacció. Com s'ha dit anteriorment, aquestes interaccions catió- π són molt freqüents a la hora d'estabilitzar estructures terciàries de proteïnes, pel que és molt probable que siguin fortament dependents de l'orientació en l'espai. Les estructures més estables que puguin adoptar els compostos conjugats per encabir el grup amidoacídic podria afectar de manera directa la interacció entre l'anell benzènic i l'amoni quaternari de la reïna, afeblint la força de l'enllaç.

4.8 AVALUACIÓ DE L'ACTIVITAT ANTIOXIDANT/ANTIRADICALÀRIA

Dels nous productes obtinguts mitjançant la despolimerització (7-15), s'ha estudiat la seva capacitat com a agents antioxidants enfront de radicals lliures. Els nous compostos foren potents agents antiradicalaris en l'assaig del radical lliure 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH) i moderats en l'assaig del radical lliure tris(2,4,6-tricloro-3,5-dinitrofenil)metil (HNTTM). El DPPH és un radical estable àmpliament emprat, el qual es redueix incorporant un àtom d'hidrogen. El mecanisme de reducció no es coneix en detall, podent consistir en la donació directa d'un àtom d'hidrogen o per una transferència electrònica seguida de l'incorporació d'un protó (Dangles *et al.*, 2000; Foti *et al.*, 2004). L'HNTTM és un radical lliure generat en col·laboració amb el laboratori de Materials Orgànics Halogenats del IIQAB-CSIC el qual només es redueix *via* transferència electrònica. L'estabilitat del HNTTM és deguda a factors estèrics, conseqüència de la presència de grups voluminosos a prop del carboni trivalent (Figura 34) (Torres *et al.*, 2003). La combinació d'ambdós estudis donà una idea de la capacitat d'una molècula per donar àtoms d'hidrogen i per transferir electrons.

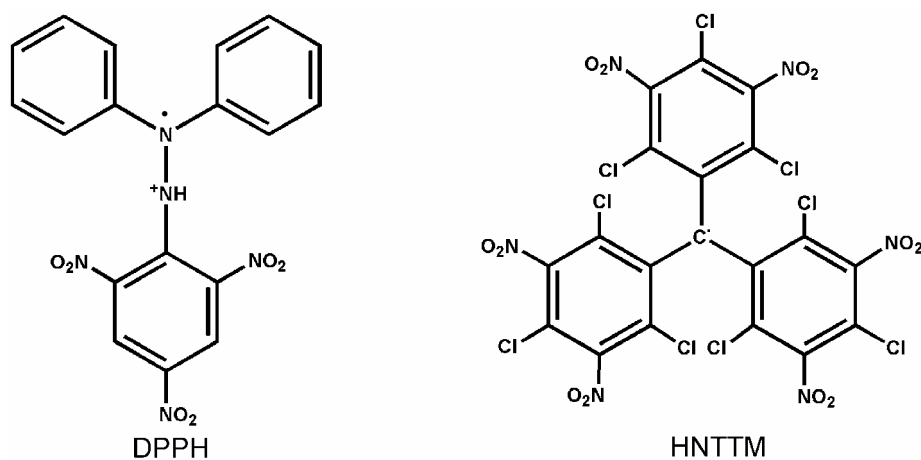


Figura 34. Estructura dels radicals estables DPPH i HNTTM.

Els assaigs amb DPPH i HNTTM es realitzaren tal com es descriuen en l'apartat 3.3.9, els resultats dels quals es troben exposats en la Taula 22 i foren expressats com a poder antiradicalari (*antiradical power*, ARP) sent aquest la inversa de la ED₅₀ (els μmols de producte capaç de consumir la meitat del radical dividit pels μmols del radical DPPH o HNTTM inicial). Per a obtenir el valor estequiomètric (la concentració teòrica del antioxidant capaç de reduir el 100% del radical) es multiplicà el ED₅₀ per dos. La inversa d'aquest valor representà el número d'àtoms d'hidrogen o d'electrons transferits per mol

d'antioxidant. Mentre que en l'epicatequina **1**, el número d'àtoms d'hidrogen donats (2,8 en l'assaig de DPPH) i el d'electrons transferits (2,4 en l'assaig d'HNTTM) va ser similar, tots els conjugats presentaren una major transferència d'àtoms d'hidrogen que d'electrons. Aquesta diferència s'expressà com un quocient entre àtoms d'hidrogen i electrons per molècula d'antioxidant (H/e⁻).

En línies generals, els productes d'epicatequina i catequina derivats amb CYS (**7-8**) i OET (**10-11**) foren capaços de transferir més molècules d'hidrogen que l'Ec (**1**), mentre que els valors de transferència electrònica foren semblants als del compost **1**. No s'observà el mateix amb els derivats sense càrrega neta NAmC (**13-14**), els quals reduïren un número de mols de DPPH semblant al compost **1** mentre mostraven menys transferència electrònica (veure Taula 22). Els resultats dels compostos gal·loitzats foren més curiosos. El derivat galat **12** mostrà una capacitat de donació d'hidrògens semblant a la de la catequina derivada **11** (5 H) sent el seu valor la meitat de la dels dos compostos galats **9** i **15** (10 H), els quals foren uns donadors d'hidrogen tant eficients com la catequina més potent en el te (EgcG, **16**). La EgcG mostrà una elevada capacitat de donació d'hidrògens, de la mateixa manera que mostrà una capacitat de transferència electrònica (6 e⁻) molt elevada, semblant a l'obtinguda pels galats **9** (6,7 e⁻) i **12** (5 e⁻) i doble a la obtinguda pel galat **15** (3 e⁻), tal com es mostra en la Taula 22 i la Figura 35.

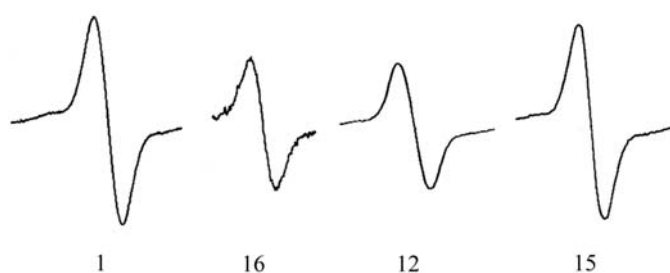


Figura 35. Espectres d'EPR com a resultat de tractar una solució del radical HNTTM (60 μ M de concentració inicial) en CH₃Cl/MeOH (2:1) amb l'epicatequina **1** i els compostos gal·loitzats EgcG **16**, EcG-OET **12** i EcG-NAmC **15** a concentració 10 μ M. Potència de microones, 20mW; freqüència de modulació, 100 kHz; amplitud de modulació, 3,2.

L'ordre de capacitat antiradicalària en funció del DPPH fou **16, 15, 9 > 12, 11 > 10, 8, 7 > 14, 13, 1**; mentre que en el cas del HNTTM fou **16, 12, 9 > 15 > 11, 10, 7, 8, 1 > 14, 13**. D'aquesta informació es destacarien dues coses: En la primera, els compostos **13** i **14** presentaren la menor capacitat antiradicalària tant en donació d'hidrògens com en transferència electrònica

(aquesta fins i tot menor que la epicatequina sense derivar). En la segona, els compostos gal·loitzats **9**, **12** i **15** mostraren propietats antioxidants inverses. Així, el compost **15** presentà una capacitat de donació d'hidrògens tant elevada com la EgcG mentre que la transferència d'electrons fou baixa. En canvi, els conjugats **9** i **12** presentaren una elevada transferència electrònica, semblant a la EgcG, mentre que la donació d'hidrògens fou menor.

Taula 22. Poder antiradicalari i estequiometria

Producte	DPPH (donació d'hidrogen)			HNTTM (transferència electrònica)			
	ARP (1/ED ₅₀)	Valor estequiomètric	àtoms d'H per molècula	ARP (1/ED ₅₀)	Valor estequiomètric	electrons per molècula ^b	H/e ⁻ ratio
Trolox	3,9	0,52	1,9	5,4	0,37	2,7	0,7
1 (Ec)	5,5	0,36	2,8	4,8	0,42	2,4	1,2
7	8,3	0,24	4,2	4,8	0,42	2,4	1,7
8	7,7	0,26	3,8	4,7	0,43	2,3	1,7
9	20	0,10	10	13,3	0,15	6,7	1,5
10	7,1	0,28	3,6	4,3	0,47	2,1	1,7
11	10,0	0,20	5,0	4,1	0,48	2,1	2,4
12	11,1	0,18	5,6	10,1	0,20	5,0	1,1
13	6,7	0,30	3,3	2,8	0,71	1,4	2,3
14	5,0	0,40	2,5	3,1	0,64	1,6	1,6
15	20,0	0,10	10,0	5,7	0,35	2,9	3,4
16(EgcG)	21,3	0,09	10,6	11,3	0,17	5,9	1,8

^a mols de DPPH reduït per mol d'antioxidant, ^b mols de HNTTM reduït per mol d'antioxidant

Desviació estàndard (n=3): ≤ 0,3 (ARP), ≤ 0,04 (valor estequiomètric), ≤ 0,2 (H ó e⁻ per molècula)

La diferència en la capacitat de transferència electrònica dels compostos que presenten un grup galat a la molècula podria indicar l'existència de diferents estructures estables que afecten a la capacitat antiradicalària del grup galat.

4.9 ESTUDI DE DEUTERACIÓ EN HIDROGENS LÀBILS

La introducció dels grups tiols amb l'amina lliure en la posició C-4 de l'epicatequina ha generat uns compostos (7-12) capaços de reduir, almenys, una molècula més de DPPH que l'Ec 1. Aquestes diferències en l'eficiència antiradicalària del DPPH, basats en l'abstracció d'un àtom de H, podria estar relacionada amb un augment del caràcter nucleòfil de les posicions C-6 i C-8 de l'anell A (veure estructura de l'Annex I.1). Aquesta evidència ve dels estudis d'RMN-¹H que es van realitzar en els primers compostos obtinguts (7-9), en els quals l'àrea dels àtoms d'hidrogen en les posicions C-6 i C-8 variava sistemàticament i fortament dependent del temps, pel que s'atribuí amb un intercanvi amb el deuteri del solvent. Aquest fenomen no va ser observat per l'Ec. Per a confirmar aquesta observació, es va voler estudiar la cinètica del procés de deuteració per RMN-¹H tot controlant el solvent, pD, concentració i temperatura. Aquest estudi es realitzà amb col·laboració amb el grup d'Applied Molecular Receptors (IIQAB-CSIC). Es diluïren els compostos 1, 4 i 7 en una solució deuterada de D₂O/acetona-*d*₆ (apartat 3.3.8) i immediatament es van començar a adquirir els espectres, tal com descriu l'apartat 3.3.8.

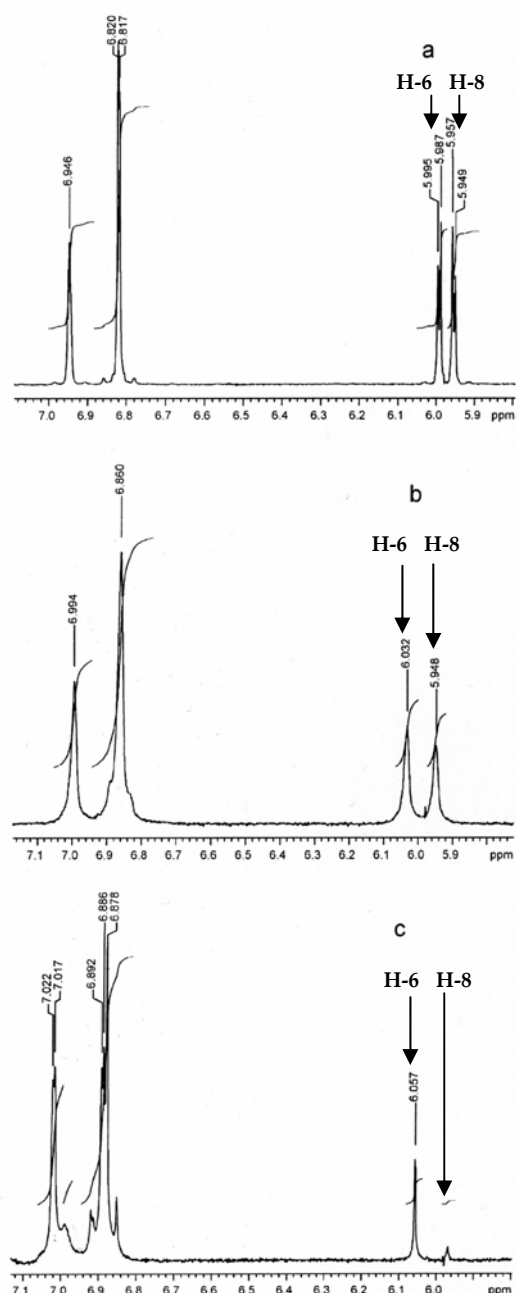


Figura 36. Espectre de RMN-¹H amb la regió aromàtica ampliada. (a) compost 1; (b) compost 4 i (c) compost 7. Els espectres foren adquirits després de 6 h en D₂O/acetona-*d*₆ (3:1 v/v) a pD=6. La senyal a 6,05 ppm correspon al H-6 i el senyal a 5,95 ppm correspon al H-8. Les senyals de camps més baixos corresponen als H-2', H-5' i H-6', insensibles al intercanvi de deuteri (Torres *et al.*, 2002a).

Els compostos **4** i **7** van mostrar un intercanvi ràpid amb deuteri en les posicions H-6 i en especial la H-8 al comparar-les amb el compost **1**, en el que no s'observà intercanvi amb deuteris (Torres *et al.*, 2002a) (Figura 36 i Annex II.3).

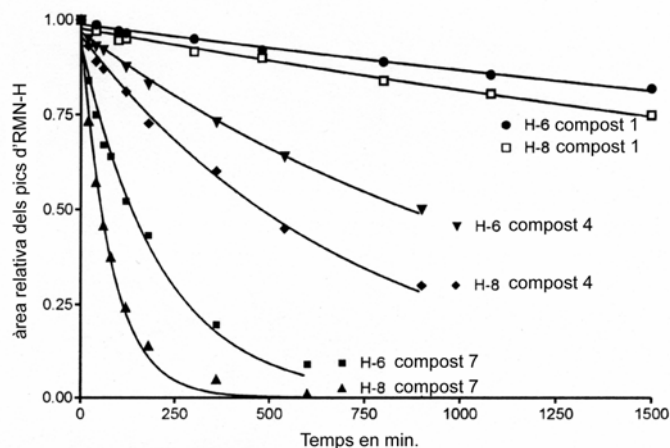


Figura 37. Evolució de les senyals de RMN-¹H H-6 i H-8 dels compostos **1**, **4** i **7** respecte el temps. La senyal està referida a la mitjana de l'àrea d'un hidrogen. Les dades s'ajustaren exponencialment. R² fou superior a 0,96 en tots els casos.

Per a representar la senyal dels H-6 i H-8 en funció del temps s'emprà un model exponencial ($r^2 > 0,96$) on es calculà la vida mitja de H-6 i H-8, sent aquesta de 150 i 57 min pel compost **7**, 911 i 511 min pel **4** i s'extrapolà a 5369 i 3851 min pel **1** (Torres *et al.*, 2002a) (Figura 37).

La conjugació dels compostos hauria afavorit un canvi en les propietats del anell A, donant com a resultat unes posicions C-6 i C-8 làbils per a reaccionar amb espècies electrofíliques.

De la mateixa manera, aquestes posicions afavoririen la regeneració d'hidroxils polifenòlics a través de la polimerització, la qual cosa podria explicar la capacitat de **4** i **7** de donar més àtoms de H que **1** (Veure Annex II.3).

Els conjugats van mostrar una capacitat d'intercanvi d'hidrògens més elevada que la epicatequina mentre mantenien baixa la capacitat de transferència electrònica. El poder antiradicalari que presentaren aquests derivats de catequines en front el DPPH vindria donat per la facilitat d'oxidar-se davant el DPPH. Està descrit que la oxidació de la (+)-catequina **2** per DPPH ocorre en dues etapes: la primera etapa, afavorida cinèticament per la formació d'una *o*-quinona, en la qual es perden dos àtoms d'hidrogen (Figura 38) (Dangles *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 1996; Kondo *et al.*, 1999a), i una segona etapa més lenta on hi hauria una regeneració dels hidroxils per la formació de dímers. Aquesta regeneració, mitjançant les posicions nucleòfiles d'altres flavanols, els permetria seguir donant àtoms d'hidrogen a favor de reduir el radical. Finalment, altres processos de polimerització seguirien regenerant hidroxils i permetent la seva acció antioxidant. Això ha estat posat de manifest per estudis de reducció del radical DPPH (Brandwilliams *et al.*, 1995; Dangles *et al.*, 1999).

En el cas de la despolimerització amb CYS i OET, la introducció de l'àtom de sofre en la posició C-4 del sistema flavànic generà la reducció de com a mínim una molècula de DPPH més que el flavanol sense derivar **1**. Es podria suggerir que les diferències en l'eficiència radicalària dels derivats **7-12** respecte al monòmer sense derivatitzar **1**, podrien estar relacionades amb un augment del caràcter nucleofílic de les posicions C-6 i C-8 del anell A, permetent una major capacitat per a regenerar els hidroxils de la *o*-quinona per polimerització (Torres *et al.*, 2002a). La presència de l'èster galat aportaria més grups hidroxils oxidables i un major número de posicions de polimerització (Guo *et al.*, 1996; Kondo *et al.*, 1999b; Torres *et al.*, 2002a) (Annex II.3).

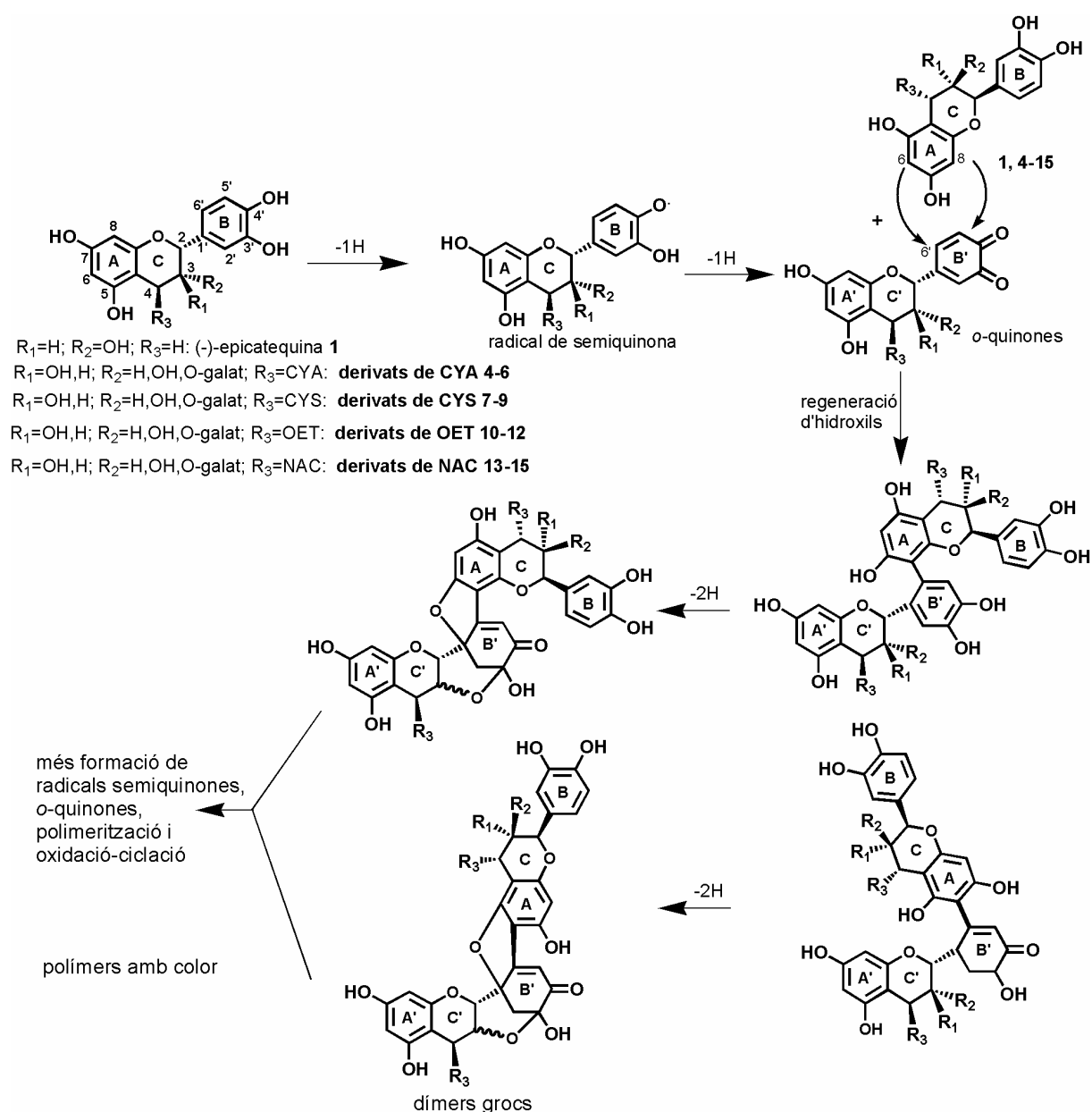


Figura 38. Esquema d'una possible regeneració dels hidroxils un cop els flavan-3-ols ja haguessin estat oxidats a quinones a partir de polimerització amb d'altres unitats, recuperant novament el seu potencial antioxidant (Torres *et al.*, 2002a).

Respecte els resultats obtinguts amb l'assaig del HNTTM, el fet que els conjugats mantinguin la transferència electrònica baixa pot tenir influència en sistemes biològics. La transferència electrònica es relaciona amb efectes tòxics o terapèutics depenent de la dosi (Kovacic *et al.*, 2002). Sota certes condicions, flavanols com la (-)-epigallocatequina (Egc) i la (-)-epigallocatequingalat (EgcG) podrien participar en cicles redox mitjançant la generació del anió radical superòxid ($O_2^{\bullet-}$) i evolucionar cap al peròxid d'hidrogen (Kondo *et al.*, 1999a, 1999b; Long *et al.*, 2000). Aquests cicles redox són menys probables per a la (-)-epicatequina o la (+)-catequina (Long *et al.*, 2000). La relació entre la transferència electrònica dels conjugats i el possible efecte en sistemes biològics és discutida al final de l'apartat 4.15.

4.10 ASSAIG *IN VITRO* DE VIABILITAT EN LÍNIES DE CULTIU CEL·LULAR

Suposadament, les propietats antioxidants dels derivats de flavanols obtinguts tenen una activitat preventiva del càncer perquè eviten mutacions carcinogèniques de tipus oxidatiu. A més, està descrit que els flavonoides tenen capacitat d'influir en la maquinària de replicació cel·lular de forma selectiva en cèl·lules tumorals.

Com les aplicacions que interessin principalment als grups involucrats en aquesta recerca són la quimioprevenició dels nous flavanols sobre el càncer de pell i colon, es portaren a terme estudis de viabilitat cel·lular, cicle cel·lular i inducció a l'apoptosi en dues línies cel·lulars de càncer de pell (melanoma), una línia de cèl·lules de pell no tumoral (queratinòcits) i una línia de càncer de colon.

4.10.1 Viabilitat cel·lular en línies de melanoma

Actualment, el melanoma ja és el cinquè càncer en incidència entre els homes i el sisè entre les dones en els Estats Units i les expectatives auguren un augment de la seva incidència d'un 5% per any (Jemal *et al.*, 2005). Hi han estudis que mostren com la llum UV exerceix els seus efectes biològics, almenys en part, *via* generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i de radicals lliures els quals juguen un paper important en la inducció de càncer de pell (Buttke *et al.*, 1994; Katiyar *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001; Slater *et al.*, 1995). Els avenços en la quimioprevenició tracten de buscar agents que ajudin tant a minimitzar la formació de ROS com a induir l'apoptosi en cèl·lules tumorals. En aquesta línia existeixen estudis amb flavonols que protegeixen cèl·lules de melanoma dels efectes nocius propis d'una radiació UV induïda (Katiyar *et al.*, 2000; Ley *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 2002; Soriani *et al.*, 1998).

4.10.1.1 Determinació del número de cèl·lules òptim

Com a pas previ per determinar les condicions bàsiques pels estudis de viabilitat, cycle cel·lular i apoptosi es van realitzar proves amb diferent número de cèl·lules. Per a cada línia cel·lular es determinà quin era el número de cèl·lules adequat per obtenir el màxim senyal de densitat òptica (DO) dins del rang de linealitat (apartat 3.4.2.1) i conèixer la concentració i temps de reacció del MTT necessari per obtenir una bona mesura.

S'inicià l'estudi amb la línia A375, seguint el protocol descrit a l'apartat 3.4.2.1, a 72 h d'incubació, ja que tots els tractaments posteriors es realitzaren a aquest temps. Es començà amb un rang ampli, de 500 a 20.000 cèl·lules per pou (Figura 39 a), acotant-se posteriorment entre 500 i 2.500 cèl·lules per pou (Figura 39 b-d). Les cèl·lules es van tractar amb el reactiu MTT a diferents temps d'incubació i concentracions: 1 mg/mL i 0,5 mg/mL durant 1 h i 0,2 mg/mL durant 4 h. Els resultats obtinguts es reflecteixen en la Figura 39. Optimitzant la concentració dels reactius i el temps, s'observà una bona resposta a 1 h d'incubació i a una concentració de 0,5 mg/mL de MTT (Figura 39 c). En aquestes condicions, es trobà una elevada DO dins la linealitat (i sense arribar a la saturació) utilitzant 1.200 cèl·lules/pou. Per tant s'emprà aquesta quantitat de cèl·lules A375 com a òptima per als posteriors experiments.

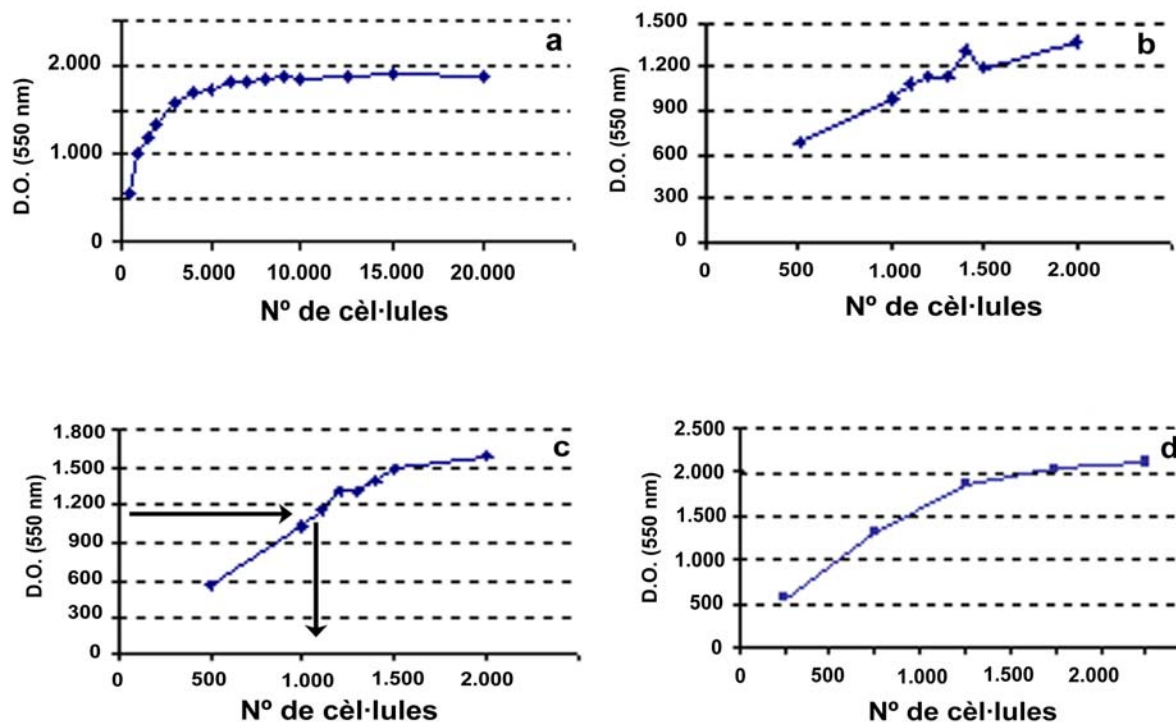


Figura 39. Representació de la DO respecte el número de cèl·lules en A375 després d'incubar 72 h i variant el contingut del MTT i el seu temps de reacció. Es mostren els resultants obtinguts a 4 h i concentració 0,2 mg/mL (a i b) i a 1 h i concentració 0,5 mg/mL (c) i 1 mg/mL (d). Per a cada punt es van realitzar un mínim de sis replicats i es van fer 3 experiments independents.

En les altres línies cel·lulars, la determinació del número de cèl·lules òptim es feu amb 0,5 mg/mL de MTT i incubant 1 h a 37°C. El número òptim de cèl·lules per les plaques de 96 pous fou: 1.500 cèl·lules/pou per a la línia de melanoma M21 i 3.000 cèl·lules/pou per a la línia de queratinòcits HaCaT.

L'interès dels flavonoides com a agents quimiopreventius és creixent. Per aquesta raó, es decidí estudiar els S-cisteinil derivats de (-)-epicatequina, (+)-catequina, i (-)-epicatequin 3-O-galat (compostos del 7 al 15), junt amb la (-)-epicatequina 1 i la 4 β -(2-aminoetiltio)epicatequina 4, tot realitzant una primera comparació del seu poder d'inhibició de la proliferació en front de dues línies de melanoma humà (A375 i M21) i una línia no tumoral de queratinòcits (HaCaT). Totes les línies van ser tractades amb quantitats creixents dels productes durant 72 h per tal d'avaluar el seu efecte. La viabilitat cel·lular i el valor que expressa la reducció de la viabilitat en un 50% (IC₅₀) es determinaren segons s'explica en l'apartat 3.4.2.2. A menor valor de IC₅₀, més potent fou el producte com a inhibidor del creixement cel·lular.

El fonament d'aquest estudi rau en la utilització del MTT per aconseguir l'estimació de la viabilitat cel·lular *in vitro*. La propietat que s'utilitza per a la mesura és la capacitat que tenen les sals de tetrazoli d'acceptar electrons de substrats reductors o de determinats coenzims, com el NADH i el NADPH, donant lloc en la seva reducció al corresponent formazan, que presenta color i pot ser quantificat colorimètricament. La bondat d'aquest mètode depèn, en part, de la suposició que tan sols les cèl·lules viables són capaces de reduir les sals, ja que les mitocòndries actives serien les responsables d'aportar la capacitat reductora. Aquesta assumpció permet correlacionar directament la quantitat de producte colorejat format amb el número de cèl·lules vives. Finalitzada la incubació, el medi amb excés de MTT s'aspirà al buit i s'hi addicionà DMSO (100 μ L). El DMSO, a elevada concentració, trenca les cèl·lules i permet la dissolució del formazan, un precipitat de color blau. La coloració resultant, proporcional a la proliferació cel·lular (degut a trobar-nos en una zona lineal) es va quantificar mesurant la densitat òptica (DO) a 550 nm i l'absorbància s'expressà com a % de viabilitat cel·lular respecte a les cèl·lules no tractades (controls).

Els resultats es van representar com a percentatge de viabilitat cel·lular *versus* la concentració del producte, tal com mostren les figures següents. En elles es compara la resposta obtinguda amb cada un dels productes avaluats.

4.10.1.2 Efecte sobre la viabilitat de la línia cel·lular A375

Després de procedir tal com es descriu a l'apartat 3.4.2.2, s'obtingueren uns valors de DO que, un cop analitzats, mostraren un descens de la viabilitat dosis-dependent provocat pels productes avaluats. Es comparà la resposta obtinguda segons el producte afegit. Pel que fa als compostos derivats amb CYS (7-9), s'observà que el més efectiu en reduir la viabilitat cel·lular fou el conjugat galat 9 (113 μM), mentre que els conjugats de catequina 8 i epicatequina 7 obtingueren una resposta semblant i major que el monòmer d'epicatequina 1 (154 μM) (Figura 40 a) (Lozano *et al.*, 2005) (Annex II.4). El mateix comportament s'observà amb els derivats de NAmC (13-15), on el conjugat galat 15 generà el major efecte (40 μM) i els conjugats d'epicatequina 13 i catequina 14 presentaren valors semblants al monòmer 1 (Figura 40 b). En canvi, amb els derivats catiónics de OET (10-12) s'observà que el derivat de catequina 11 presentà un major efecte (45 μM) que el compost galat 12 (117 μM) i el derivat d'epicatequina 10 (153 μM), el qual presentà un valor idèntic al monòmer 1 (Figura 40 c).

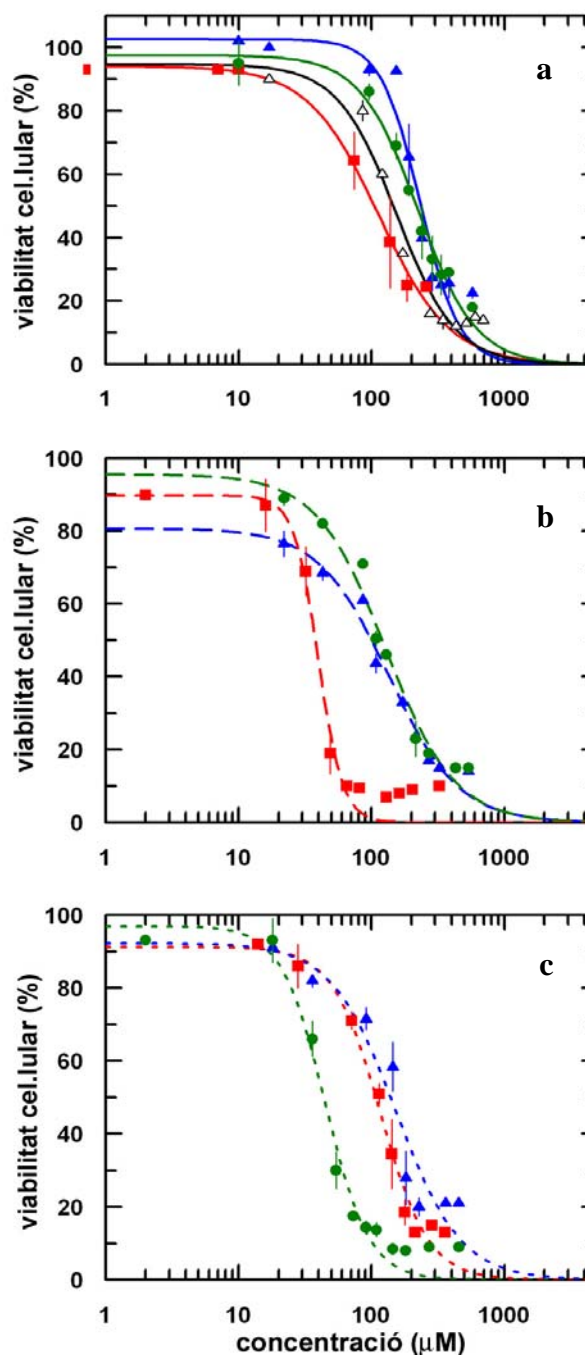


Figura 40. Viabilitat cel·lular de la línia A375 en resposta al tractament amb quantitats creixents dels productes epicatequina (Ec, Δ línia negra) i dels derivats d'Ec (\blacktriangle línia blava), derivats de Cat (\bullet línia verda) i derivats d'EcG (\blacksquare línia vermella). La seva viabilitat es va determinar mitjançant el mètode d'entrada del formazan en les cèl·lules viables. **a**, resposta de l'Ec i els derivats de CYS (línia contínua). **b**, resposta dels derivats de NAmC (línia discontinua). **c**, resposta dels derivats de OET (línia puntejada). Per a cada punt es van realitzar un mínim de tres replicats i es van fer 5 experiments independents.

4.10.1.3 Efecte sobre la viabilitat de la línia cel·lular M21

Els resultats obtinguts amb la línia cel·lular M21 foren concordants amb els obtinguts amb la línia cel·lular de melanoma A375 descrits anteriorment. Així, d'entre els compostos derivats amb CYS (7-9) el conjugat galat **9** mostrà el major efecte inhibidor sobre la viabilitat cel·lular, i els conjugats d'epicatequina **7** i catequina **8** mostraren un efecte semblant al monòmer **1** (332 μM , Figura 41 a) (Lozano *et al.*, 2005) (Annex II.4). D'entre els conjugats amb NAmC també el conjugat galat **15** fou més efectiu (52 μM), seguit del derivat de catequina **14** (281 μM) i finalment el derivat d'epicatequina mostrà un valor molt més elevat (483 μM) respecte el monòmer **1** (Figura 41 b). Els derivats amb OET presentaren un comportament semblant als CYS, on el més efectiu fou el derivat de catequina **11** (85 μM), per sobre del conjugat galat **12** (134 μM) i del derivat d'epicatequina **10** (204 μM), èssent tots els valors menors que l'obtingut pel monòmer **1** (Figura 41 c).

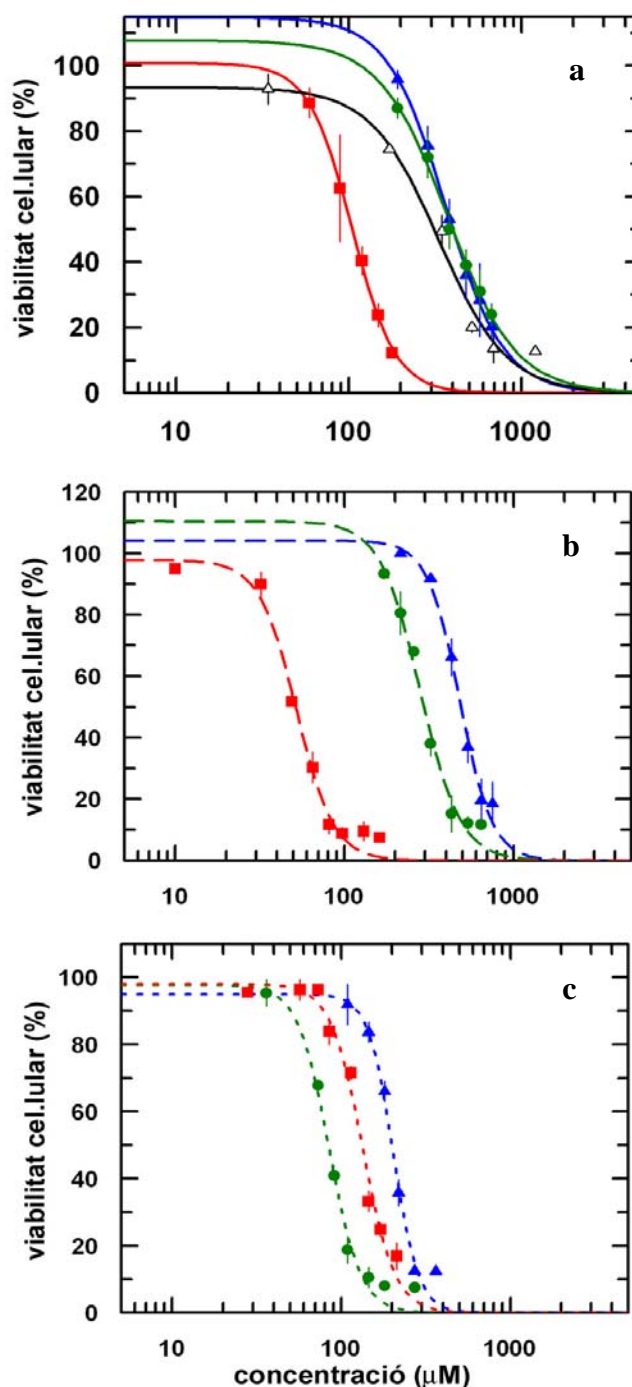


Figura 41. Viabilitat cel·lular de la línia M21 en resposta al tractament amb quantitats creixents dels productes epicatequina (Ec, Δ línia negra) i dels derivats d'Ec (\blacktriangle línia blava), derivats de Cat (\bullet línia verda) i derivats d'EcG (\blacksquare línia vermella). La seva viabilitat es va determinar mitjançant el mètode d'entrada del formazan en les cèl·lules viables. **a**, resposta de l'Ec i els derivats de CYS (línia contínua). **b**, resposta dels derivats de NAmC (línia discontinúta). **c**, resposta dels derivats de OET (línia puntejada). Per a cada punt es van realitzar un mínim de tres replicats i es van fer 5 experiments independents.

4.10.2 Viabilitat cel·lular en la línia no tumoral de queratinòcits

Es va emprar la línia cel·lular de queratinòcits HaCaT per tal de veure si els efectes induïts pels conjugats de CYS eren selectius per a les cèl·lules tumorals.

4.10.2.1 Efecte sobre la viabilitat de la línia cel·lular HaCaT

L'efecte que exerceixen els productes sobre la viabilitat en les cèl·lules HaCaT fou semblant a l'obtingut sobre les línies de melanoma. Aquest fet no és sorprenent si es té en compte que tot i no ser tumorals, la línia HaCaT són cèl·lules transformades. Pel que fa als compostos derivats amb CYS, el conjugat galat **9** mostrà el major efecte ($116 \mu\text{M}$) i amb el derivat d'epicatequina **7** s'obtingué un valor menor ($391 \mu\text{M}$) que l'obtingut pel monòmer **1** ($1193 \mu\text{M}$, Figura 42 a) (Lozano *et al.*, 2005) (Annex II.4). Els derivats de NAmC mostraren un perfil similar a les línies anteriors, essent el compost galat **15** el més efectiu ($127 \mu\text{M}$) i obtenint-se una resposta semblant (al voltant de $350 \mu\text{M}$, Figura 42 b) pels derivats d'epicatequina **13** i catequina **14**. A diferència de les línies tumorals, el derivat galat de OET **12** es mostrà com el més efectiu ($75 \mu\text{M}$) seguit del derivat de catequina **11** ($136 \mu\text{M}$) i del d'epicatequina **10** ($321 \mu\text{M}$, Figura 42 c).

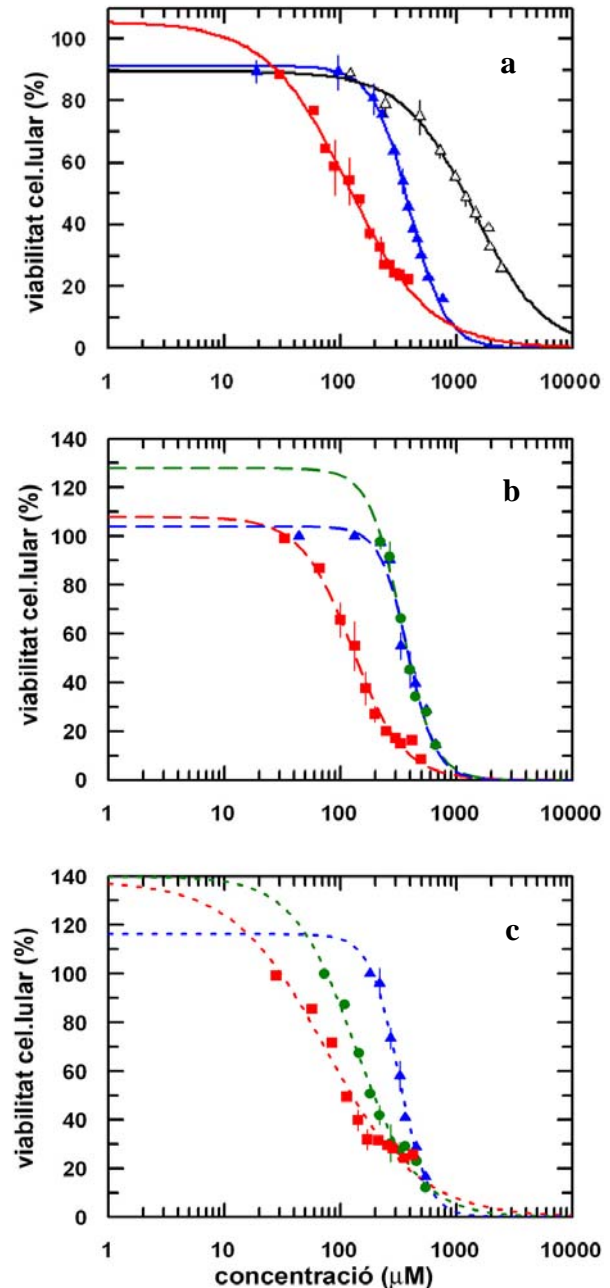


Figura 42. Viabilitat cel·lular de la línia HaCaT en resposta al tractament amb quantitats creixents dels productes epicatequina (Ec, Δ línia negra) i dels derivats d'Ec (\blacktriangle línia blava), derivats de Cat (\bullet línia verda) i derivats d'EcG (\blacksquare línia vermella). La viabilitat es determinà com en els melanomes. **a**, resposta de l'Ec i els derivats de CYS (línia contínua). **b**, resposta dels derivats de NAmC (línia discontinua). **c**, resposta dels derivats de OET (línia puntejada). Per a cada punt es van realitzar un mínim de tres replicats i es van fer 4 experiments independents.

Els valors de IC₅₀ obtinguts per a cada compost en les cèl·lules HaCaT i en les cèl·lules de melanoma descrites anteriorment es resumeixen en la Taula 23 per tal de facilitar-ne la comparació. A menor IC₅₀ més efectiu és el compost en disminuir la viabilitat de la línia cel·lular.

Taula 23. Resum de les IC₅₀ trobades per a cada compost en les tres línies cel·lulars

Compostos	A375		M21		HaCaT	
	mitjana	± DE	mitjana	± DE	mitjana	± DE
Ec, 1	154	15	332	39	1193	84
CYS-Ec, 7	231	14	363	18	391	6
CYS-Cat, 8	223	10	365	14	--	--
CYS-EcG, 9	113	6	104	4	116	17
OET-Ec, 10	153	32	204	9	321	19
OET-Cat, 11	45	4	85	4	136	34
OET-EcG, 12	117	9	134	5	75	36
NAmC-Ec, 13	135	18	483	19	386	20
NAmC-Cat, 14	127	17	281	26	338	43
NAmC-EcG, 15	40	3	52	3	127	10

En línies generals, s'observà un comportament similar dels productes en front de les dues línies cel·lulars de melanoma, on el derivat galat generà una reducció de la viabilitat més efectiva que els respectius conjugats sense galat, excepte en el cas del derivat amb OET **12**.

S'ha de destacar també que els compostos derivats sense galat presentaren uns efectes sobre la viabilitat semblants a l'observat amb el monòmer d'epicatequina **1**. Aquesta disminució de la viabilitat del derivat que conté galat està en concordància amb el descrit per als productes amb grup galat sense derivar. Així, Valcic i col·laboradors descriuen que EcG **3** exerceix un major efecte antiproliferatiu que la Ec **1** sobre diferents línies tumorals (Tan *et al.*, 2000; Valcic *et al.*, 1996). Tot i això, encara no s'ha assentat cap explicació plausible del mecanisme que fa que els derivats que contenen galat siguin agents més eficaços de la mateixa manera que no s'ha trobat un vincle entre la capacitat antioxidant dels mateixos i la corresponent capacitat de reduir la viabilitat cel·lular.

L'efecte sobre la línia no tumoral HaCaT mostrà com tots els derivats foren més efectius que el monòmer **1**, sent els conjugats que contenen un grup galat els més potents. El rang de concentració de la IC₅₀ dels productes es trobà en la mateixa escala que en les línies tumorals

degut a que la línia HaCaT, tot i no ser tumoral correspon a cèl·lules transformades que es poden mantenir en cultiu cel·lular indefinidament, com qualsevol línia cel·lular tumoral. En cèl·lules de queratinòcits normals, s'ha observat que els compostos galats tal com EgcG **16** no inhibeixen la proliferació sinó que indueixen la diferenciació (Balasubramanian *et al.*, 2005; Eckert *et al.*, 2004). A més, s'ha descrit que quan els queratinòcits són irradiats amb llum UV, el compost EgcG indueix la proliferació i supervivència per contrarestar l'efecte negatiu de la radiació (Chung *et al.*, 2003).

Els flavanols (i especialment les catequines) han demostrat capacitat per disminuir la viabilitat de cèl·lules canceroses (Katiyar *et al.*, 1997; Valcic *et al.*, 1996). Els resultats obtinguts en aquest treball demostren que els nous derivats de flavanols no han perdut aquesta capacitat i suggereixen l'existència de diferències significatives en l'efecte sobre la viabilitat cel·lular de cadascuna de les catequines respecte una mateixa línia i també entre línies diferents. Comparant entre els compostos obtinguts, els derivats amb CYS foren els menys eficaços, possiblement degut a que la seva naturalesa, molt més polar que els altres compostos (que es troben mono i di-esterificats), els dificultà atravesar la membrana o bé afectà a les interaccions posteriors. La seva diferent efectivitat també podria estar relacionada amb la facilitat per formar oligòmers, explicada en l'apartat 4.9, i també amb una diferent capacitat d'accedir al lloc d'acció, determinada pel caràcter del grup substituent (CYS, OET o NAmC) en la posició C-4. Per altre banda, els compostos més eficaços en les línies tumorals de melanoma foren el derivat OET de catequina **11** i el derivat galat de NAmC **15**, mentre que el derivat galat **12** ho fou de la línia no tumoral. Respecte els conjugats galats, el compost **15** fou dues vegades més efectiu que els altres compostos galats **9** i **12** en les línies tumorals de melanoma.

La IC₅₀ dels productes d'interès ens donà una idea del seu poder inhibitori en proliferació cel·lular que, juntament amb la seva activitat antioxidant/antiradicalària (veure apartat 4.8), suggereixen una possible aplicació dels nous compostos com a agents preventius de tumors amb capacitat per inhibir-los en les seves fases inicials.

Per assolir aquest nou objectiu es va mirar si aquesta disminució es donava aturant el cicle cel·lular en alguna de les seves fases o si es trobaven involucrats en d'altres mecanismes.

4.11 EFECTE DELS FLAVANOLS CONJUGATS AMB CYS SOBRE EL CICLE CEL·LULAR EN LÍNIES CEL·LULARS DE PELL

4.11.1 Efecte dels flavanols conjugats sobre el cicle cel·lular en la línia A375

Es van cultivar les cèl·lules tal com es descriu a l'apartat 3.4.3.1, sembrant 35.000 cèl·lules/pou en plaques de 6 pous. Després de fer el tractament descrit a l'apartat 3.4.3.2, es va veure que el cicle cel·lular de les cèl·lules control restà constant al llarg de tot l'experiment. El percentatge d'aquestes cèl·lules control fou de $57 \pm 1\%$ en la fase G_0/G_1 , $28 \pm 2\%$ en la fase S i $15 \pm 1\%$ en la fase G_2/M després de 72 h de tractament, tal com es mostra en el diagrama de la distribució cel·lular obtingut mitjançant l'anàlisi per FACS (Figura 43, dades expressades com valor mig del percentatge de cèl·lules en cada fase \pm DE). El següent pas fou afegir els productes derivats de CYS (7-9), juntament amb el monòmer **1**, en una concentració equivalent a les respectives IC_{50} 24 h després de sembrar les cèl·lules i, posteriorment, incubant-los 72 h més. Al processar els resultats no s'observaren gaires diferències respecte la distribució de les cèl·lules control. Així que s'incubaren a concentració doble de la IC_{50} i s'obtingueren unes dades de cicle cel·lular que presentaren lleugeres variacions respecte el control excepte pel conjugat galat **9**, que presentà una clara aturada en la fase S (amb percentatge de $23 \pm 6\%$ de cèl·lules en la fase G_0/G_1 , $50 \pm 23\%$ en la fase S i $27 \pm 4\%$ en la fase G_2/M , com a mitja de tres experiments independents, Figura 43).

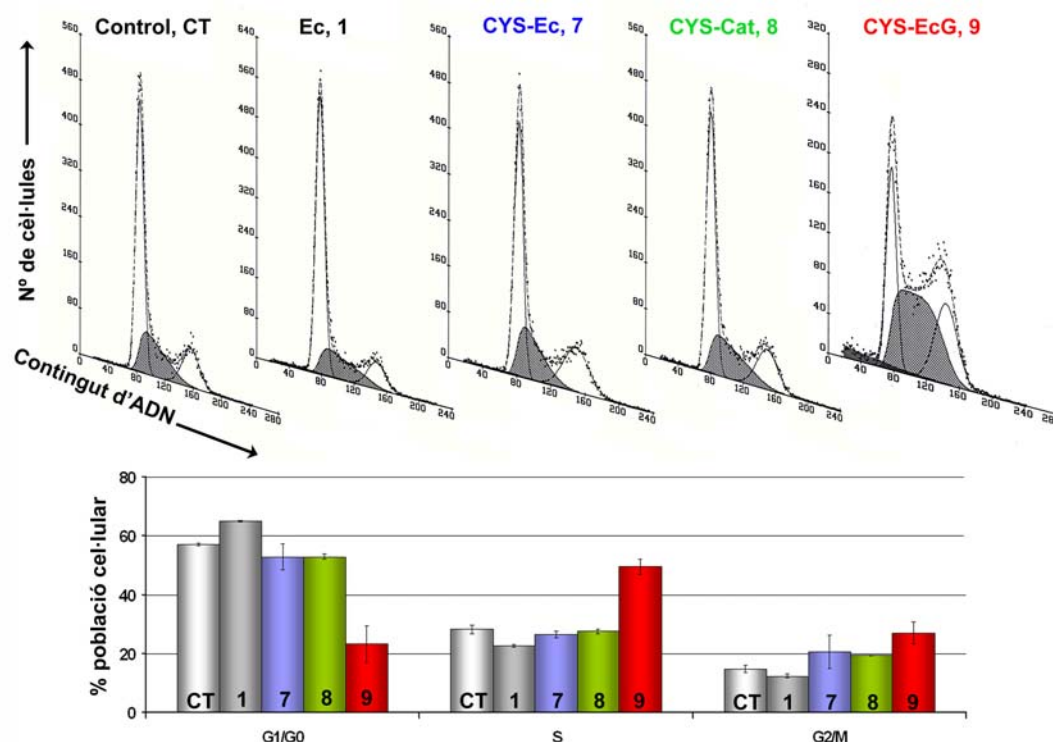


Figura 43. Diagrames de la distribució del cicle cel·lular en la línia A375. Cèl·lules sense tractar a 72 h de incubació (CT) i cèl·lules tractades durant 72 h amb 310 μM de **1** (gris), 420 μM de **7** (blau) i **8** (verd) i 237 μM de **9** (vermell). La distribució cel·lular es va determinar utilitzant la citometria de flux per FACS i s'expressà com a percentatge de cèl·lules en les diferents fases del cicle: G_1/G_0 , S i G_2/M , tal com mostra el diagrama de barres. Els valors mostrats representen la mitja \pm DE per $n \geq 3$ experiments.

4.11.2 Efecte dels flavanols conjugats sobre el cicle cel·lular en la línia M21

Les cèl·lules de melanoma M21 es cultivaren en les mateixes condicions que les A375 i es determinà l'efecte sobre el cicle cel·lular dels productes derivats. Per a les cèl·lules no tractades (control) s'obtingué una distribució de $35 \pm 3\%$ de cèl·lules en la fase G_0/G_1 , $46 \pm 2\%$ en la fase S i $18 \pm 3\%$ en la fase G_2/M després de 72 h d'incubació, tal com es mostra en el diagrama de la distribució cel·lular (Figura 44, dades expressades com valor mig del percentatge de cèl·lules en cada fase \pm DE). Igual que amb l'altre línia cel·lular, s'addicionaren els derivats (**1**, **7-9**) a concentracions corresponents al doble de les respectives IC_{50} i passades les 72 h de incubació les diferents mostres s'analitzaren per FACS tot obtenint-se uns resultats de distribució cel·lular semblants a l'altre línia de melanoma: el monòmer **1** ($33 \pm 5\%$ de cèl·lules en G_0/G_1 , $52 \pm 5\%$ en S i $15 \pm 7\%$ en G_2/M) i els derivats **7** ($26 \pm 3\%$ de cèl·lules en G_0/G_1 , $56 \pm 6\%$ en S i $17 \pm 3\%$ en G_2/M) i **8** ($24 \pm 3\%$ de cèl·lules en G_0/G_1 , $58 \pm 5\%$ en S i $18 \pm 4\%$ en G_2/M) presentaren lleugeres variacions respecte les cèl·lules control,

mentre que el conjugat galat **9** presentà una aturada en fase S ($5 \pm 4\%$ de cèl·lules en G_0/G_1 , $84 \pm 3\%$ en S i $11 \pm 6\%$ en G_2/M), tal com es mostra a la Figura 44.

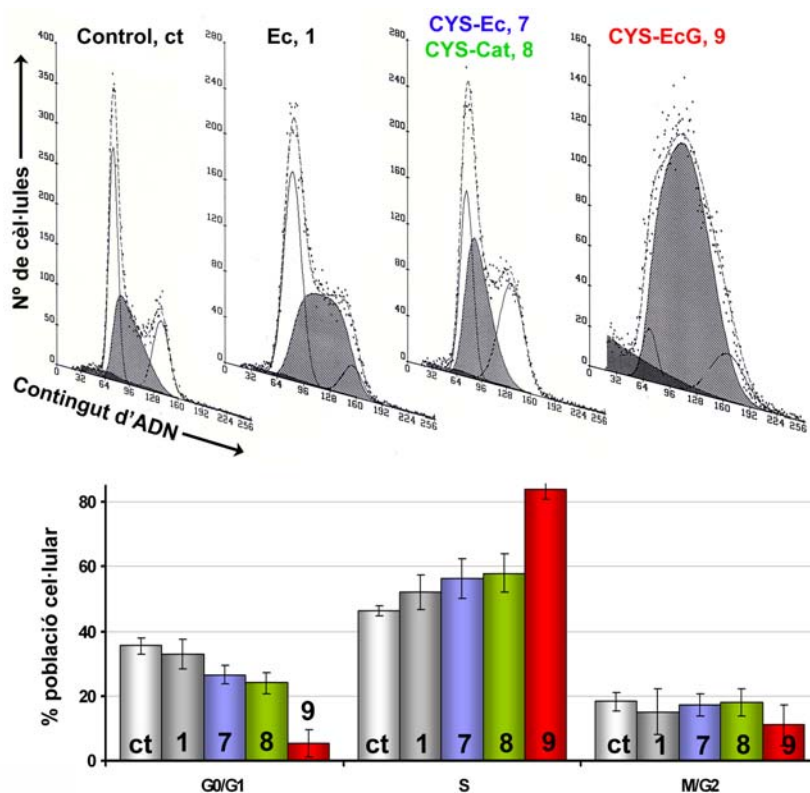


Figura 44. Diagrames de la distribució del cicle cel·lular en la línia M21. Cèl·lules sense tractar a 72 h de incubació (CT) i cèl·lules tractades durant 72 h amb $660 \mu\text{M}$ de **1** (gris), $720 \mu\text{M}$ de **7** (blau) i **8** (verd) i $208 \mu\text{M}$ de **9** (vermell). La distribució cel·lular es va determinar utilitzant la citometria de flux per FACS i s'expressà com a percentatge de cèl·lules en les diferents fases del cicle: G_1/G_0 , S i G_2/M , tal com mostra el diagrama de barres. Els valors mostrats representen la mitja \pm DE per $n \geq 3$ experiments.

4.11.3 Efecte dels flavanols conjugats sobre el cicle cel·lular en la línia HaCaT

Després de veure el comportament dels compostos derivats amb CYS en línies de melanoma, es mirà quina era la resposta en una línia de queratinòcits no tumoral.

Es van cultivar les cèl·lules tal com es descriu a l'apartat 3.4.3.1, sembrant 85.000 cèl·lules/pou en plaques de 6 pous. Després de fer el tractament descrit a l'apartat 3.4.3.2, es va veure que el cicle cel·lular de les cèl·lules control restà constant al llarg de tot l'experiment. El percentatge d'aquestes cèl·lules control en les diferents fases del cicle cel·lular fou de $38 \pm 2\%$ en la fase G_0/G_1 , $40 \pm 1\%$ en la fase S i $22 \pm 2\%$ en la fase G_2/M després de 72 h de tractament. Aquests valors es compararen amb les cèl·lules tractades amb l'epicatequina **1** i els seus corresponents derivats **7** i **9**. A les concentracions corresponents a les respectives IC_{50} no

s'observaren diferències significatives respecte les cèl·lules control, tal com es mostra en la Figura 45 (part superior). A concentracions corresponents al doble de la IC₅₀, la distribució cel·lular del compost 1 ($38 \pm 1\%$ de cèl·lules en G₀/G₁, $37 \pm 2\%$ en S i $25 \pm 1\%$ en G₂/M) i del compost 7 ($44 \pm 4\%$ en G₀/G₁, $41 \pm 6\%$ en S i $14 \pm 3\%$ en G₂/M) seguí sent semblant a la presentada pel control, però s'observà un pic sub-G₁ que podria ser indicatiu d'apoptosi o necrosi. En el cas del compost galat 9, es produí una aturada en la fase S ($24 \pm 8\%$ de cèl·lules en G₀/G₁, $76 \pm 5\%$ en S i $3 \pm 4\%$ en G₂/M) tal com s'observà també en les línies de melanoma però el pic sub-G₁ no es detectà (Figura 45).

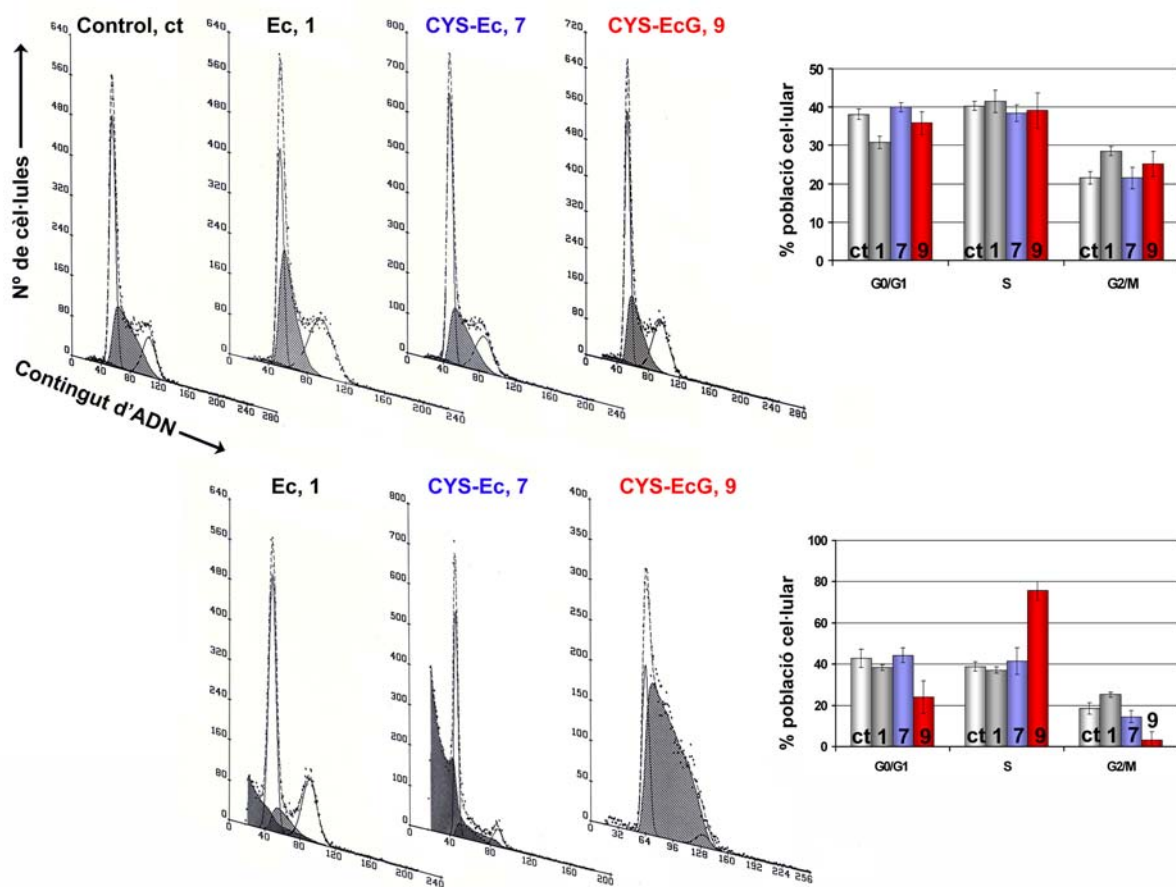


Figura 45. Diagrames de la distribució del cycle cel·lular en la línia HaCaT. Cèl·lules sense tractar a 72 h de incubació (CT) i cèl·lules tractades durant 72 h amb 1.900 μ M de 1 (gris), 390 μ M de 7 (blau) i 120 μ M de 9 (vermell) mostrades en la part superior de la figura, que correspondria als valors de IC₅₀. En la part inferior les cèl·lules foren tractades durant 72 h amb dosis dobles a la IC₅₀ de 3.000 μ M de 1, 780 μ M de 7 i 240 μ M de 9. La distribució cel·lular es va determinar utilitzant la citometria de flux per FACS i s'expressà com a percentatge de cèl·lules en les diferents fases del cycle: G₁/G₀, S i G₂/M, tal com mostren els diagrames de barres de cadascuna de les parts. Els valors mostrats representen la mitja \pm DE per $n \geq 3$ experiments.

En les línies tumorals de melanoma assajades s'ha observat que l'únic producte que generà una alteració significativa del cicle cel·lular fou el derivat que contenia el grup galat **9**. El fet que el conjugat galat **9** causés una aturada en la fase S del cicle mentre que el seus homòlegs sense el grup galat no causin cap efecte significat a concentracions dobles a la seva IC₅₀ indica que l'estructura del grup galat podria ser responsable, almenys en part i potser de manera indirecta, d'aquest efecte en el cicle cel·lular (Lozano *et al.*, 2005; Salucci *et al.*, 2002) (Annex II.4).

Aquest resultat està amb concordància amb la literatura, on el monòmer gal·loitzat del te (EgcG, **16**) mostrà també un bloqueig en la transició de G1 a S. La majoria de càncers presenten els reguladors del cicle cel·lular modificats. Aquests reguladors estan formats per una família de complexos de proteïn quinases, tal com s'ha comentat en la Introducció. En el cas concret del càncer de colon i la EgcG, s'ha vist que la transició que bloqueja el compost EgcG està regulada per dos complexos de quinases, la cdk4 i la cdk2, les quals són inhibides pel compost galat (Gupta *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2002). Una degeneració en la regulació de les quinases pot influir en processos cancerosos (Kolibaba *et al.*, 1997).

Cada cop sembla més clar que l'efecte dels flavanols sobre el cicle cel·lular no estigui relacionat amb la capacitat antioxidant que presenten, sinó amb la capacitat d'interaccionar amb els enzims quinases. Compostos com l'àcid gàl·lic també s'han mostrat efectius a l'hora d'interferir en el cicle cel·lular de les cèl·lules tumorals amb els mateixos resultats obtinguts per la EgcG, mentre que d'altres compostos sense el grup galat com la catequina i la quercetina no han mostrat aquest efecte (Salucci *et al.*, 2002).

4.12 CAPACITAT D'INDUIR APOPTOSI DELS FLAVANOLS CONJUGATS AMB CYS SOBRE LES LÍNIES DE PELL

S'ha caracteritzat l'efecte dels productes derivats a nivell d'alteració del cicle cel·lular en les diferents línies de melanoma i queratinòcits. Posteriorment s'analitzaren també si les alteracions en el cicle cel·lular observades es corresponen amb una inducció de l'apoptosi (Ormerod, 2002; Pucci *et al.*, 2000) utilitzant diferents metodologies complementaries.

4.12.1 Anàlisi per citometria: FACS i LSC

Per realitzar aquesta tasca i poder diferenciar el procés d'apoptosi del de necrosi, les mostres s'analitzaren per citometria emprant FACS i LSC amb els reactius cromòfors d'anexina FITC i iodur de propidi (IP) (Vermees *et al.*, 1995). Aquesta última tècnica permeté discriminar visualment entre cèl·lules apoptòtiques i necròtiques.

4.12.1.1 Inducció de l'apoptosi en la línia A375

Les cèl·lules A375 foren tractades amb els compostos **1**, **7-9** sota les mateixes condicions que es van emprar en l'apartat 4.11.1. Transcorregudes 72 h d'incubació, aquestes foren tractades tal com es descriu a l'apartat 3.4.4.1, observant-se que els compostos en la seva IC₅₀ incrementaren lleument el número de cèl·lules apoptòtiques en els estadis inicials (IP⁻/FITC⁺) i avançats (IP⁺/FITC⁺) respecte el control. Emprant concentracions més elevades dels productes (2 x IC₅₀) s'observà que el número de cèl·lules apoptòtiques fou quatre vegades superior al valor del control pel cas del conjugat galat **9** mentre que pels compostos **1**, **7** i **8** el número de cèl·lules apoptòtiques augmentà el doble que en el control. En la Figura 46 es mostren els diagrames obtinguts per FACS, on el quadrant inferior dret de cada diagrama mostra el número de cèl·lules en un estadi inicial d'apoptosi (IP⁻/FITC⁺) i el superior dret mostra el número de cèl·lules en un estadi avançat d'apoptosi (IP⁺/FITC⁺). Per discriminar si les cèl·lules que es troben en els quadrants drets del diagrama segueixen un patró de mort cel·lular per apoptosi o necrosi, s'emprà la tècnica del LSC, que ens permeté visualitzar les cèl·lules dels diferents quadrants a través d'observacions al microscopi. La metodologia fou similar a l'anterior, tal com es descriu a l'apartat 3.4.4.2. En particular, s'utilitzà aquesta tècnica per analitzar l'efecte del conjugat **9** que fou el que generà major apoptosi a la concentració més elevada (8% de cèl·lules en el quadrant inferior dret i 13% en el superior dret). Les cèl·lules del quadrant inferior dret (IP⁻/FITC⁺) observades pel microscopi de LSC

mostraren una limitada fragmentació nuclear i tinció verda en la membrana, indicant la típica morfologia dels primers estadis de l'apoptosi, on hi ha la unió de l'anexina V-FITC en la fosfatidilserina translocada present en la membrana. Pel que fa a les cèl·lules del quadrant corresponent a una apoptosi avançada o necrosi (superior dret) l'anàlisi per LSC mostrava que les cèl·lules seguien el mecanisme d'apoptosi degut a l'avançada fragmentació nuclear i tinció de nuclis condensats observats, símptoma irreversible d'apoptosi en estadis avançats just abans de formar-se els cossos apoptòtics que serien posteriorment eliminats pels macròfags.

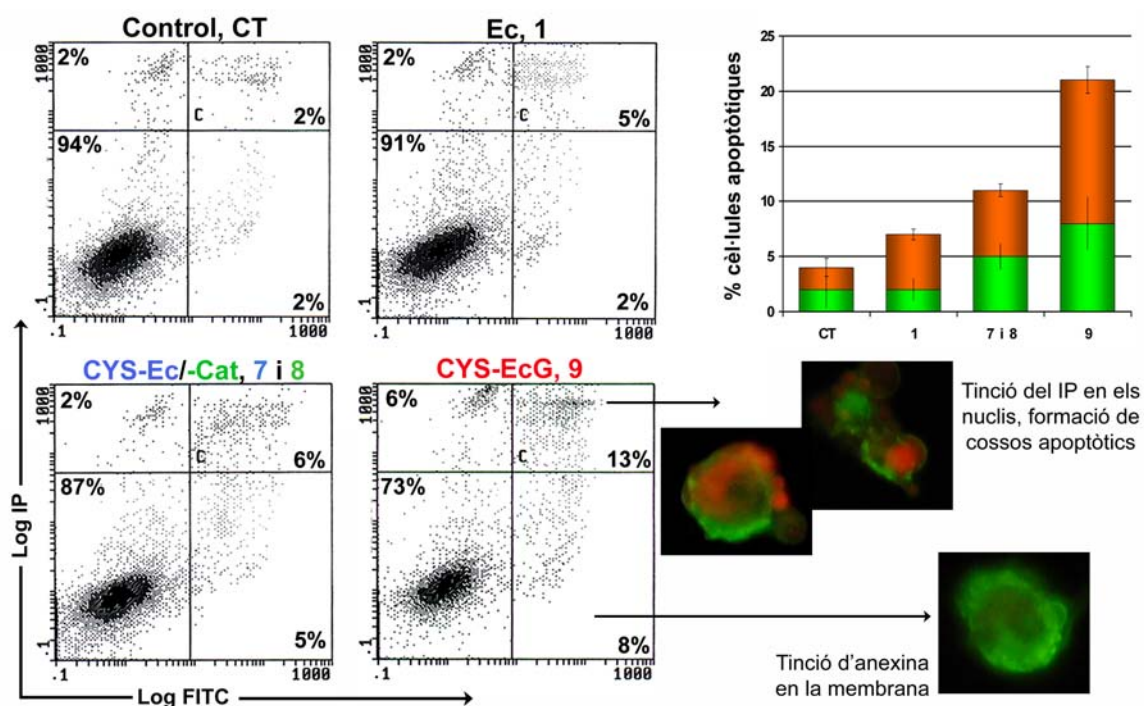


Figura 46. Anàlisi de la distribució cel·lular segons la fluorescència present en cadascuna de les cèl·lules, adquirida en un citofluorímetre de flux (FACS). Els quadrants de Log FITC *versus* Log IP reflexen la distribució de cèl·lules segons presentin tinció per iodur de propidi (IP, eix Y) o per anexina V/FITC (eix X). El diagrama de barres mostra el percentatge de cèl·lules en apoptosi primerenca (color verd, tinció per anexina) i d'apoptosi avançada (color taronja, doble tinció d'anexina i IP) en cèl·lules sense tractar (CT) i en cèl·lules tractades durant 72 h amb 310 μ M de 1; 420 μ M de 7 i 8; 237 μ M de 9. Les imatges han estat fetes mitjançant la càmera incorporada a la tècnica del LSC, on el color verd representa la tinció amb anexina V/FITC i el color vermell representa la tinció amb IP. L'anàlisi que es mostra és representatiu de quatre experiments independents.

4.12.1.2 Inducció de l'apoptosi en la línia M21

Les cèl·lules de M21 es tractaren amb els productes **1** i **7-9** de la mateixa manera que es tractaren en A375, obtenint-se resultats similars. També en aquesta línia de melanoma, a concentracions de dues vegades la respectiva IC_{50} , s'obtingueren resultats equivalents als obtinguts en les cèl·lules A375 on el nombre de cèl·lules apoptòtiques fou quatre vegades superior al valor del control en les tractades amb el conjugat galat **9** i el doble en les tractades amb els altres productes **1**, **7** i **8**. (Figura 47).

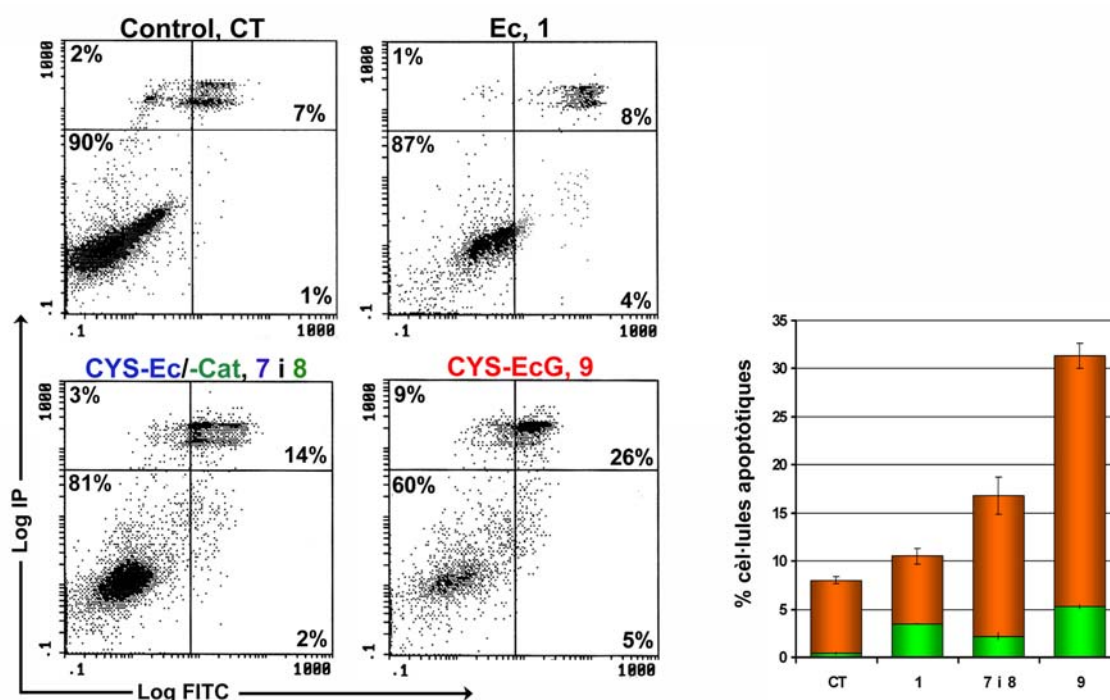


Figura 47. Anàlisi de la distribució cel·lular segons la fluorescència present en cadascuna de les cèl·lules, adquirida en un citofluorímetre de flux (FACS). Els quadrants de Log FITC *versus* Log IP reflexen la distribució de cèl·lules segons presentin tinció per iodur de propidi (IP, eix Y) o per anexina V/FITC (eix X). El diagrama de barres mostra el percentatge de cèl·lules en apoptosi primerenca (color verd, tinció per anexina) i d'apoptosi avançada (color taronja, doble tinció d'anexina i IP) en cèl·lules sense tractar (CT) i en cèl·lules tractades durant 72 h amb 660 μ M de **1**; 720 μ M de **7** i **8**; 208 μ M de **9**. L'anàlisi que es mostra és representatiu de tres experiments independents.

4.12.1.3 Inducció de l'apoptosi en la línia HaCaT

La línia no tumoral es tractà amb els mateixos conjugats de CYS a la concentració corresponent a la seva IC₅₀ i a concentració doble de la IC₅₀ en les mateixes condicions que es tractaren les cèl·lules de melanoma. A concentració de IC₅₀ s'observà que el monòmer **1** i els conjugats **7** i **8** induïen aproximadament el doble d'apoptosi que en les cèl·lules control. Sorprenentment, el compost galat **9** no presentà inducció de l'apoptosi en aquesta línia cel·lular no tumoral (Figura 48 a). A concentracions doble de les respectives IC₅₀, els compostos **1**, **7** i **8** mostraren una incident inducció a l'apoptosi, deu vegades superior al control. En canvi, el conjugat **9** tampoc induí apoptosi a la concentració més elevada (Figura 48 b). Aquesta observació invertia els resultats obtinguts en les cèl·lules tumorals, on l'únic compost que induïa apoptosi era el conjugat galat **9**.

El fet que un compost amb elevada capacitat antioxidant i inductor de l'apoptosi en cèl·lules tumorals de melanoma no induís apoptosi en una línia cel·lular de queratinòcits es considerà un resultat important en una primera valoració de la seva possible utilitat com a antitumoral. Aquesta observació es complementà amb d'altres estudis trobats en la literatura en que el compost EgcG generà diferenciació però no apoptosi en línies no tumorals (Chen *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2003; Balasubramanian *et al.*, 2005).

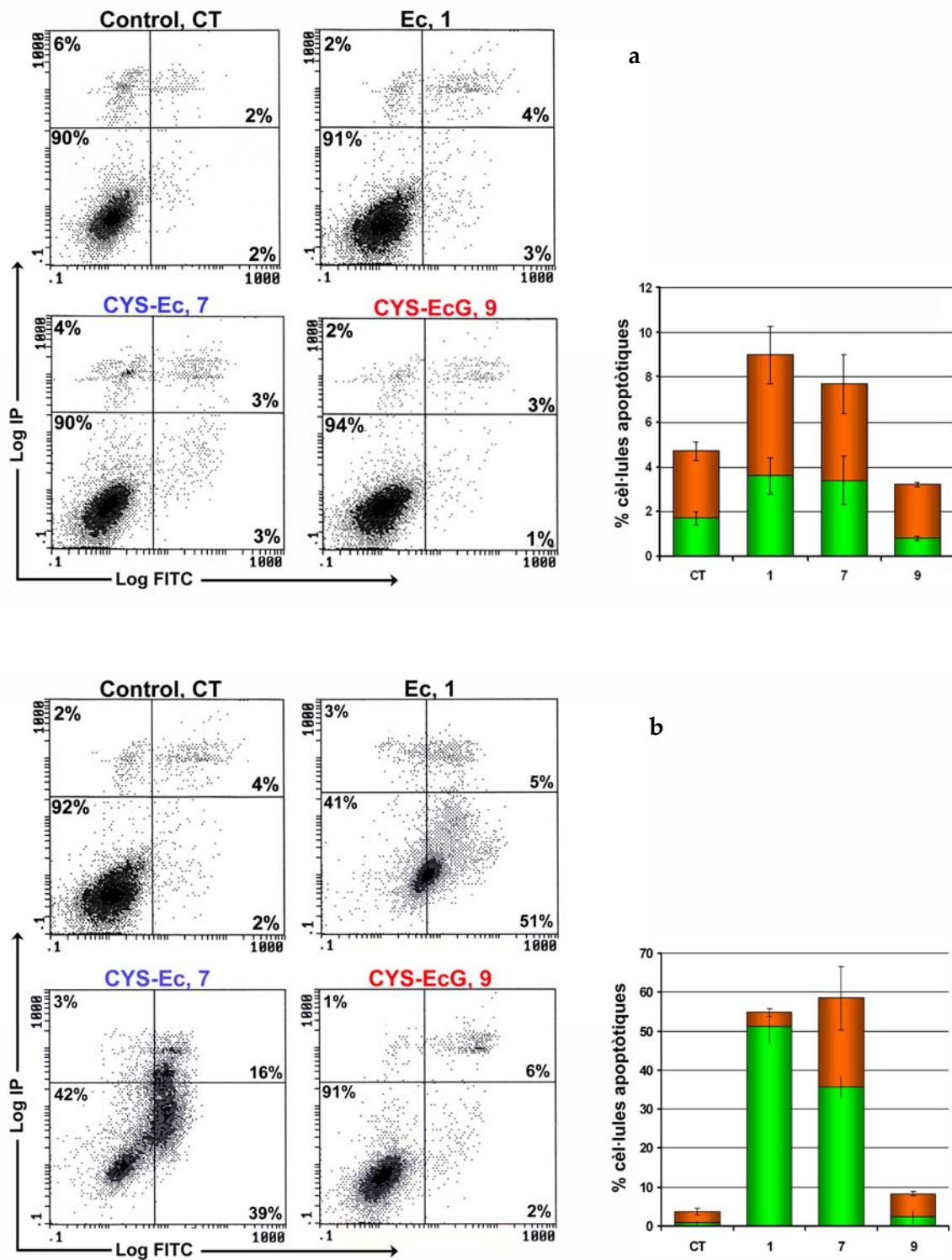


Figura 48. Anàlisi de la distribució cel·lular segons la fluorescència present en cadascuna de les cèl·lules, adquirida en un citofluorímetre de flux (FACS). Els quadrants de Log FITC *versus* Log IP reflexen la distribució de cèl·lules segons presentin tinció per iodur de propidi (IP, eix Y) o per anexina V/FITC (eix X). El diagrama de barres mostra el percentatge de cèl·lules en apoptosi primerenca (color verd, tinció per anexina) i d'apoptosi avançada (color taronja, doble tinció d'anexina i IP) en cèl·lules sense tractar (CT) i en cèl·lules tractades durant 72 h amb 1.900 μM de **1**; 390 μM de **7**; 120 μM de **9** (a) i cèl·lules tractades amb 3.000 μM de **1**; 780 μM de **7**; 240 μM de **9** (b). L'anàlisi que es mostra és representatiu de tres experiments independents.

Aquests resultats suggerien una relació entre el cicle cel·lular i els mecanismes d'inducció a l'apoptosi, que podria ser concordant amb el que descriuen d'altres autors sobre la possible influència de les ciclin-quinases tan a nivell de regular el cicle cel·lular com d'influir en l'apoptosi (Pucci *et al.*, 2000; Ormerod, 2002). Així s'observà que el producte amb el grup galat (**9**), que fou el que generà una aturada en la fase S del cicle cel·lular en les dues línies tumorals de melanoma, també fou l'únic que induí l'apoptosi de manera significativa. No obstant, en el cas de la línia no tumoral HaCaT, els resultat foren inversos èssent el compost **9** l'únic que generà aturada en la fase S del cicle i que no induí apoptosi, mentre que els compostos **1**, **7** i **8** induïren apoptosi significativament sense afectar la distribució del cicle. Per tal de confirmar els resultats obtinguts d'inducció a l'apoptosi específicament en les cèl·lules tumorals i no en les no tumorals (HaCaT) es realitzà també l'anàlisi de la morfologia cel·lular per tinció nuclear de Hoechst i l'anàlisi de la fragmentació de l'ADN per electroforesi tal com es descriu en els següents apartats.

4.12.2 Anàlisi de la morfologia cel·lular per tinció nuclear amb Hoechst

Per tal de corroborar que el compost **9** indueix apoptosi en melanoma i no en queratinòcits, s'utilitzà la tècnica de tinció nuclear amb Hoechst sobre les línies de A375 i HaCaT. Com ja s'ha comentat anteriorment, les cèl·lules apoptòtiques es distingeixen fàcilment ja que es caracteritzen per presentar la cromatina condensada i l'ADN fragmentat.

Les cèl·lules es tractaren amb una dosi doble de la IC₅₀ després del pre-tractament de 24 h, tal com es feu en citometria, i es procedí tal com s'indica a l'apartat 3.4.4.3. A les 72 h de tractament i després de incubar-ho amb el reactiu Hoechst, ja s'observà tinció tant en les cèl·lules control com a les tractades. Els controls d'A375 i HaCaT presentaren una tinció homogènia per tot el nucli circular (veure microscopia Figura 49).

Les mostres d'A375 tractades amb el producte **9** (200 µM) presentaren un menor número de cèl·lules i, aquestes, mostraren una tinció heterogènia amb una intensitat major en els extrems nuclears degut a la compactació de la cromatina. En algunes cèl·lules s'observaren, fins i tot, nuclis apoptòtics (senyalats amb fletxes blanques) que indicaren un estadi avançat en el procés d'apoptosi.

Les cèl·lules d'HaCaT tractades amb el mateix producte també mostraren una disminució de la viabilitat cel·lular, però no tant pronunciat com en les A375, i el nombre de nuclis

apoptòtics no fou significativament diferent al del control (Figura 49). Aquesta tècnica confirmà que el conjugat **9** induí una major apoptosi en la línia de melanoma A375 per la visualització de la condensació de cromatina i la formació de cossos apoptòtics, mentre que en la línia no tumoral HaCaT aquesta inducció no fou significativa, tot i que va disminuir el número de cèl·lules viables.

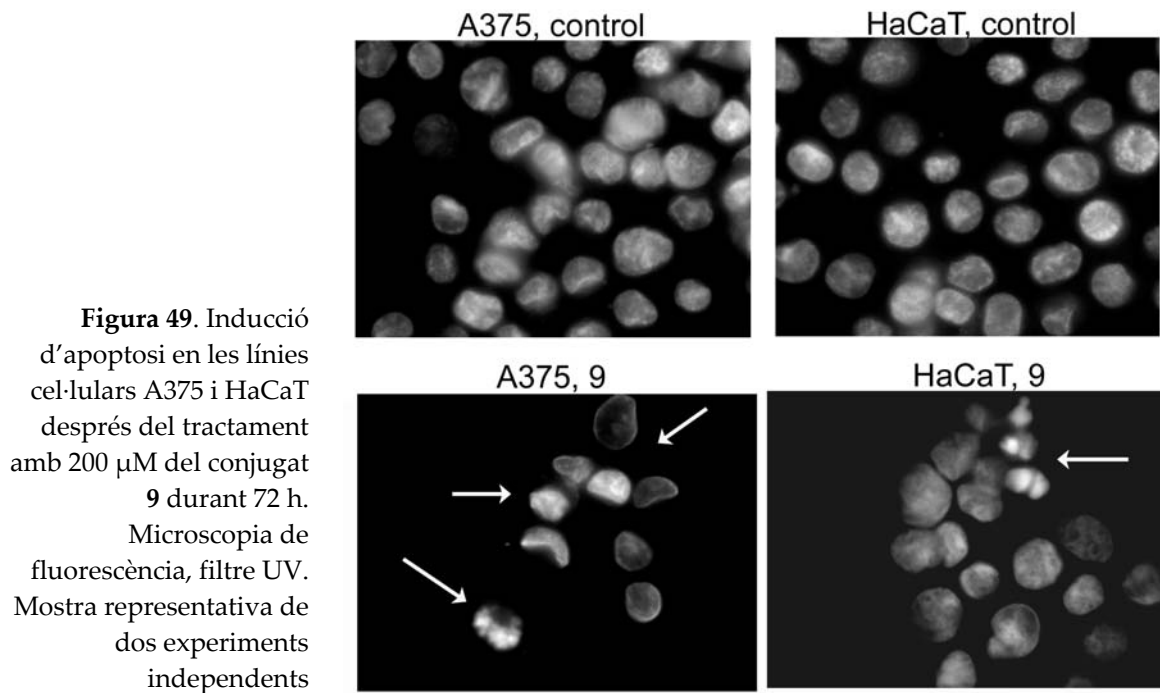


Figura 49. Inducció d'apoptosi en les línies cel·lulars A375 i HaCaT després del tractament amb 200 μ M del conjugat **9** durant 72 h. Microscopia de fluorescència, filtre UV. Mostra representativa de dos experiments independents

4.12.3 Anàlisi de la fragmentació d'ADN per electroforesi

Per últim es va corroborar l'efecte diferencial del compost **9** sobre les línies A375 i HaCaT analitzant la seva capacitat d'induir fragmentació de l'ADN. Els trencaments de la doble hèlix de l'ADN són produïts per endonucleases que s'estimulen durant el procés de l'apoptosi, generant-se diversos fragments oligonucleosomals els quals formarien la característica escala que s'observa mitjançant l'electroforesi de l'ADN (Gerschenson *et al.*, 1992). La fragmentació de l'ADN ocorre en els estadis finals de l'apoptosi, i mostra fragments d'ADN repetitius de diverses mides entre 200 i 2000 parells de bases.

Per realitzar aquesta anàlisi es treballà amb un número de cèl·lules molt superior que en els anteriors estudis. Així, es sembrà 1 milió de cèl·lules i, després de 24 h de pre-incubació i les posteriors 72 h de tractament, s'obtingueren uns controls amb aproximadament 12 milions de cèl·lules A375 i 9 milions de cèl·lules HaCaT (Figura 50, controls).

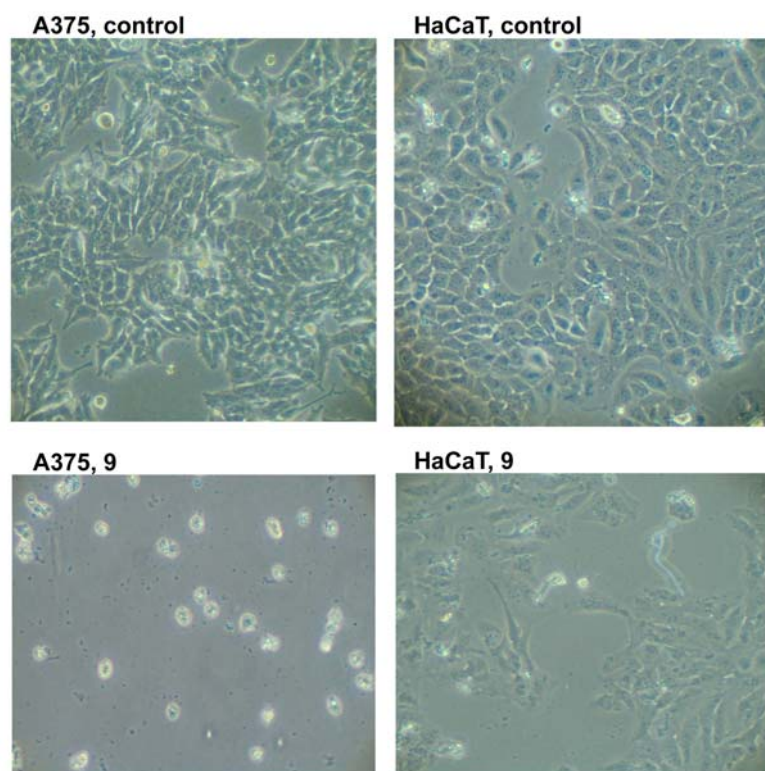


Figura 50. Fotografies de les cèl·lules A375 i HaCaT a les 72 h d'incubació amb i sense compost **9**, realitzades a través del microscopi invertit. Tot i reduir la viabilitat cel·lular en ambdues línies, el seu mecanisme d'acció és diferent tal com es discuteix més endavant. Aquest fet també s'observa visualment per la diferent morfologia de les cèl·lules tractades. Mostra representativa de sis experiments d'electroforesi diferents

Les cèl·lules es tractaren amb el conjugat **9** a concentració 200 μM tal com es descriu en l'apartat 3.4.4.4. Al finalitzar les 72 h d'incubació, s'extragué l'ADN del extracte cel·lular i, després de comprovar la seva puresa respecte l'ARN mitjançant l'absorbància de la mostra a 260 i 280 nm (apartat 3.4.4.4.2) i de quantificar-lo (apartat 3.4.4.4.3), es realitzà l'electroforesi carregant 5, 10, 20 i 30 μg d'ADN, dels diferents extractes cel·lulars: un extracte de cèl·lules sense tractar (control negatiu), un extracte de cèl·lules tractades durant les darreres 5 h d'incubació amb estaurosporina a concentració final de 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Stp, control positiu) i un últim extracte de cèl·lules incubades amb el conjugat galat **9**. En cap de les dues línies cel·lulars s'observà una fragmentació específica en els extractes tractats amb el conjugat **9**, mentre que el tractament amb estaurosporina (un inductor d'apoptosi comercial) mostrà un fraccionament específic d'ADN en ambdues línies cel·lulars.

Es pensà que la *ratio* d'apoptosi a 72 h del conjugat **9** en la línia A375 era insuficient per detectar-ne els cossos apoptòtics (segons la tècnica de FACS, aproximadament un 20% de les cèl·lules es trobaren en apoptosi a les 72 h i de les quals un 13% corresponien als estadis finals que és on es donaria la fragmentació nuclear). Addicionar més quantitat de producte per augmentar la *ratio* d'apoptosi possiblement induiria també una major reducció de la viabilitat obtenint menys quantitat d'extracte. Així que s'optà per augmentar el temps d'incubació per

tal d'obtenir un major número de cèl·lules en els estadis finals d'apoptosi sense haver de variar la quantitat del compost **9**.

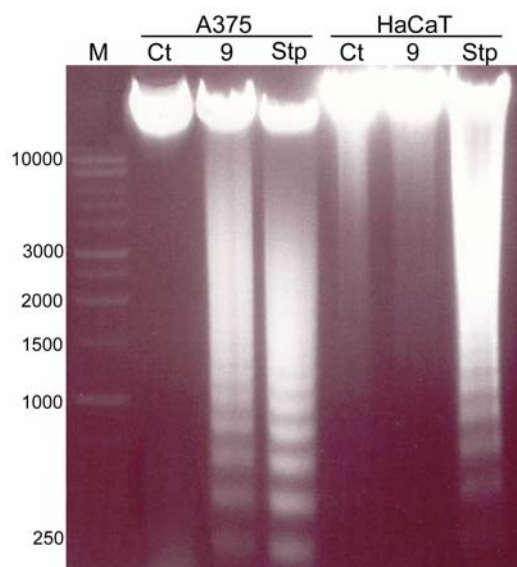


Figura 51. Electroforesi en gel d'agarosa. Les cèl·lules foren incubades amb el compost **9** (200 μ M) o estaurosporina (control positiu, 2 μ M) durant 120 h. L'ADN fou extret i analitzat per electroforesi (20 μ g d'ADN per carril). **M** és el marcador de tamany. Electroforesi representativa de sis experiments diferents.

Després d'incubar les mostres durant 120 h i de seguir el procediment de la mateixa manera, s'observà que l'estaurosporina seguí generant fraccionament en ambdues línies cel·lulars, mentre que el compost **9** generà fraccionament en l'ADN de les cèl·lules tumorals d'A375, però no en les cèl·lules d'HaCaT (Figura 51, electroforesi representativa de tres experiments independents). El fraccionament d'ADN en fragments repetitius és considerat un símbol inequívoc d'apoptosi que, juntament amb els altres indicis recollits amb el Hoechst i citòmetre, confirmaria la capacitat del conjugat **9** d'induir apoptosi específicament en la línia tumoral.

La majoria de productes emprats avui en dia en teràpies del càncer maten les cèl·lules per activació indirecta de reguladors d'apoptosi, afectant a l'ADN d'una forma generalitzada i sense cap control, induint toxicitat en les cèl·lules sanes properes. Un exemple prometedori per evitar aquest dany col·lateral seria el producte lapacona, el qual provoca una aturada en la fase S del cicle cel·lular, induint selectivament apoptosi en cèl·lules canceroses i no en cèl·lules proliferants sanes (Li *et al.*, 2003). El nou flavanol derivat 4 β -(S-cisteinil)epicatequin 3-O-galat (CYS-EcG, **9**) obtingut en aquest treball mostrà una capacitat antioxidant equivalent al producte majoritari del te EgcG, amb l'avantatge que la capacitat antiradicalària del compost **9** és induïda més per donació d'àtoms d'hidrogen que per transferència electrònica, on aquesta última està relacionada amb efectes pro-oxidants (Kondo *et al.*, 1999b; Kovacic *et al.*, 2000; Long *et al.*, 2000; Kovacic *et al.*, 2001; Kovacic, 2005). A més, aquest compost **9** induïx una aturada de les cèl·lules tumorals en la fase S del cicle cel·lular i una selectiva inducció de l'apoptosi en les línies de melanoma, però no en

queratinòcits proliferants. D'altres autors defensen el paper de EgcG com a responsable d'un efecte de diferenciació cel·lular en queratinòcits sense induir apoptosi (Eckert *et al.*, 2004; Balasubramanian *et al.*, 2005) de la mateixa manera que inhibeix l'apoptosi induïda en queratinòcits per una radiació UV (Kondo *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005). També s'ha observat que el conjugat **9** presenta la capacitat de reduir la viabilitat cel·lular de totes les línies cel·lulars i el mecanisme pel qual realitza l'acció és diferent segons es tracti de línies tumorals (A375 i M21 en les quals atura el cicle en la fase S i activa en un últim terme l'apoptosi) o de línies no tumorals proliferants (HaCaT, on actua a nivell de cicle cel·lular però no indueix apoptosi).

Molt d'esforç s'està dedicant en aquesta última dècada per intentar elucidar quin és el mecanisme pel qual aquests compostos polifenòlics indueixen apoptosi. Per això, primer s'hauria de determinar si actuen directament sobre la diana cel·lular o són els seus metabòlits i si la inducció a l'apoptosi és una resposta directament relacionada amb la seva presència o, pel contrari, activen o regulen algun senyal que, indirectament, induirà l'apoptosi. Podria ser que part de la resposta residís en el grup galat, ja que diversos autors en descriuen la seva capacitat d'induir apoptosi mentre que els seus derivats sense galat no en presenten (Chen *et al.*, 1998; Ahmad *et al.*, 2000b; Kondo *et al.*, 2004; Balasubramanian *et al.*, 2005). Aquest fenomen també ha sigut observat en aquest treball en les línies tumorals de A375 i M21 i en la línia no tumoral de HaCaT, tot comparant la diferent resposta apoptòtica dels derivats **7** (sense grup galat) i **9**.

4.13 VIABILITAT CEL·LULAR EN LA LÍNIA TUMORAL DE CÀNCER DE COLON

Els flavonols acostumen a ser ingerits per l'ésser humà a través de la dieta, sent el colon l'última etapa on acaben sent degradats. El càncer de colon i recte és el tercer en incidència tant en homes com en dones en el 2005 i s'estima un increment de la seva incidència d'un 10% per any (Jemal *et al.*, 2005). En l'última dècada s'ha multiplicat l'interès dels polifenols com a possible tractament contra el càncer de colon induint l'apoptosi de les cèl·lules canceroses (Yang *et al.*, 1998; Wenzel *et al.*, 2000; Briviba *et al.*, 2002; Salucci *et al.*, 2002; Baek *et al.*, 2004). Tot i l'èxit mostrat en sistemes *in vitro*, s'ha de tenir en compte la capacitat d'absorció i/o degradació dels diferents oligòmers i la possible metabolització de les unitats

monomèriques un cop dins l'organisme (Agullo *et al.*, 1996; Deprez *et al.*, 2000; Rice-Evans, 2001; Ross *et al.*, 2002; Scalbert *et al.*, 2002; Manach *et al.*, 2004; Spencer *et al.*, 2004).

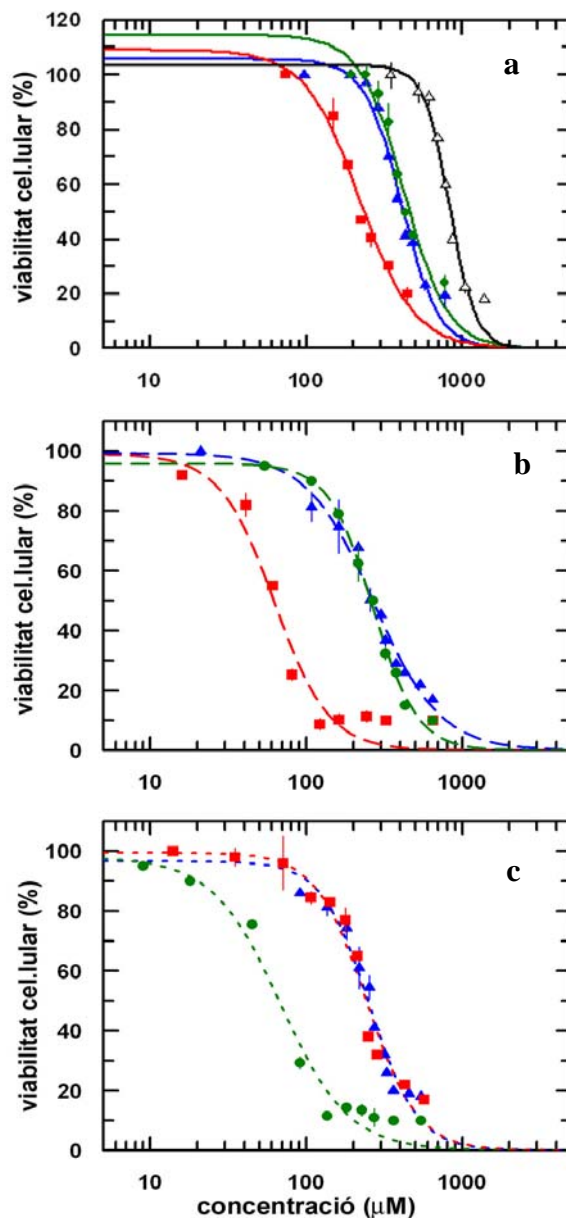
4.13.1 Determinació del número de cèl·lules òptim

La determinació del número de cèl·lules òptim en la línia d'adenocarcinoma de colon HT29 es feu amb 0,5 mg/mL de MTT i incubant 1 h a 37°C, tal com es realitzà en l'apartat 4.10.1.1. Es trobà que el número òptim de cèl·lules per les plaques de 96 pous fou de 2.500 cèl·lules/pou per aquesta línia cel·lular.

4.13.2 Efecte sobre la viabilitat de la línia cel·lular HT29

De la mateixa manera que es feu amb les línies cel·lulars de melanoma (apartat 4.10.1), la línia de càncer de colon (HT29) va ser tractada amb quantitats creixents dels productes durant 72 h per tal d'avaluar el seu efecte. La viabilitat cel·lular i el valor de IC₅₀ es determinà segons s'explica en l'apartat 3.4.2.2.

Figura 52. Viabilitat cel·lular de la línia HT29 en resposta al tractament amb quantitats creixents dels productes epicatequina (Ec, Δ línia negra), derivats d'Ec (\blacktriangle línia blava), derivats de Cat (\bullet línia verda) i derivats d'EcG (\blacksquare línia vermella). Es va determinar la viabilitat mitjançant el mètode d'entrada del formazan en les cèl·lules viables. **a**, resposta de l'Ec i els derivats de CYS (línia contínua). **b**, resposta dels derivats de NAMC (línia discontinua). **c**, resposta dels derivats de OET (línia puntejada). Per a cada punt es van realitzar un mínim de tres replicats, i es van fer 4 experiments independents.



En la línia HT29 els efectes sobre la viabilitat obtinguts amb aquests compostos flavonoides foren semblants als descrits anteriorment sobre les línies de melanoma. Amb els derivats de CYS, el compost galat **9** presentà la reducció de viabilitat més efectiva (219 μM), mentre que els conjugats d'epicatequina **7** i catequina **8** mostraren valors similars (400 μM) èssent menors que el monòmer **1** (826 μM , Figura 52 a) (Torres *et al.*, 2002a) (Annex II.3). Amb els derivats de NAmC, el derivat galat **15** seguí sent el més efectiu (62 μM) i els derivats d'epicatequina **13** i catequina **14** presentaren valors similars (267 μM , Figura 52 b). Amb els derivats de OET, es segueix la tendència que es va observà amb les línies de melanoma, essent el derivat de catequina **11** el més efectiu (68 μM), seguit del conjugats d'epicatequina **10** i d'epicatequin galat **12** (250 μM , Figura 52 c).

Els valors de IC₅₀ obtinguts per a cada compost en les cèl·lules HT29 es resumeixen en la Taula 24 per tal de facilitar-ne la comparació.

Taula 24. Resum de les IC₅₀ trobades per a cada compost en la línia cel·lular HT29

Compostos	HT29	
	mitjana	\pm DE
Ec, 1	826	12
CYS-Ec, 7	407	21
CYS-Cat, 8	421	26
CYS-EcG, 9	219	7
OET-Ec, 10	255	13
OET-Cat, 11	68	10
OET-EcG, 12	243	15
NAmC-Ec, 13	268	15
NAmC-Cat, 14	267	7
NAmC-EcG, 15	62	12

Els resultats obtinguts en la línia de càncer de colon, HT29, foren similars als de les altres línies tumorals de melanoma, essent els conjugats galats els més efectius en la disminució de la proliferació cel·lular en HT29 excepte en el compost galat **12**, que obtingué un valor similar al del seu conjugat homòleg sense el grup galat **11** (veure Taula 24). En aquesta línia tumoral cal destacar que tots els productes derivats foren més efectius que el propi monòmer **1**.

La capacitat dels flavanols com l'epicatequina, la catequina i l'epicatequin 3-O-galat en inhibir la proliferació cel·lular en línies de càncer de colon, entre elles la línia HT29, ha estat àmpliament demostrada en treballs científics (Agullo *et al.*, 1996; Valcic *et al.*, 1996; Uesato *et al.*, 2001; Salucci *et al.*, 2002; Baek *et al.*, 2004) i on igualment s'observà que el compost galat mostrava la major capacitat d'inhibició. El mecanisme mitjançant el qual es realitza la inhibició no està del tot establert i es suggereixen diverses vies: des de la interacció d'aquests compostos amb receptors de viabilitat cel·lular de la membrana com el TGF- β (Baek *et al.*, 2004) fins a relacionar-ho amb la capacitat d'induir apoptosi (Uesato *et al.*, 2001).

El que està clar és que depèn fortament de l'estructura que adopti el compost, ja que en aquesta línia cel·lular s'observa com una catequina conjugada sense grup galat (**11**) presenta una capacitat d'inhibició en el rang dels compostos galats. Així, tot i que el grup galat confereix a la molècula unes propietats que el fan més eficient com a inhibidor de la proliferació, no hi ha en aquests moments una relació directa estructura-activitat.

Tal com es va fer amb les cèl·lules de melanoma, a continuació s'estudià l'efecte d'aquests productes sobre el cicle cel·lular de la línia HT29.

4.14 EFECTE DELS FLAVANOLS CONJUGATS OET I NAmC SOBRE EL CICLE CEL·LULAR EN LA LÍNIA HT29

Es van cultivar les cèl·lules HT29 tal com es descriu a l'apartat 3.4.3.1, sembrant 73.000 cèl·lules/pou en plaques de 6 pous i, transcorregudes les 72 h d'incubació, es tractaren tal com s'ha descrit a l'apartat 3.4.3.2. Per a les cèl·lules sense tractar (control) la distribució en percentatge de cèl·lules en les diferents fases del cicle cel·lular fou de $38 \pm 3\%$ en la fase G_0/G_1 , $38 \pm 1\%$ en la fase S i $24 \pm 2\%$ en la fase G_2/M (Figura 53). En aquesta línia cel·lular els compostos assajats foren els derivats amb OET (**10-12**) i NAmC (**13-15**) juntament amb el monòmer **1**. Cadascun d'ells s'addicionaren al cultiu cel·lular a la corresponent concentració de IC_{50} i s'incubaren durant 72 h. La distribució de cèl·lules en les diferents fases del cicle cel·lular que s'obtingué pel monòmer **1** és semblant a l'obtinguda per a les cèl·lules control, essent de $33 \pm 5\%$ en G_0/G_1 , $39 \pm 1\%$ en S i $27 \pm 2\%$ en G_2/M . En el cas dels derivats amb OET, la distribució obtinguda per als derivats **10** ($32 \pm 2\%$ en G_0/G_1 , $43 \pm 5\%$ en S i $25 \pm 3\%$ en G_2/M) i **11** ($40 \pm 5\%$ en G_0/G_1 , $36 \pm 1\%$ en S i $24 \pm 4\%$ en G_2/M) fou similar a l'obtinguda per al monòmer **1** i les cèl·lules control, mentre que el derivat galat **12** mostrà diferències significatives amb aturada en la fase S ($23 \pm 1\%$ en G_0/G_1 , $68 \pm 5\%$ en S i $9 \pm 5\%$ en G_2/M), anàlogament al que s'obtingué per al derivat galat de CYS. En el cas dels derivats de NAmC s'observà que el conjugat galat **15** no mostrà cap diferència significativa en la distribució respecte el control ($36 \pm 1\%$ en G_0/G_1 , $38 \pm 1\%$ en S i $26 \pm 1\%$ en G_2/M), mentre que en els compostos derivats d'epicatequina **13** i catequina **14** s'observà un lleuger augment no significatiu de cèl·lules en la fase S ($28 \pm 5\%$ de cèl·lules en G_0/G_1 , $48 \pm 6\%$ en S i $24 \pm 9\%$ en G_2/M pel conjugat **13** i $26 \pm 11\%$ de cèl·lules en G_0/G_1 , $48 \pm 3\%$ en S i $25 \pm 6\%$ en G_2/M pel conjugat **14**, veure Figura 53).

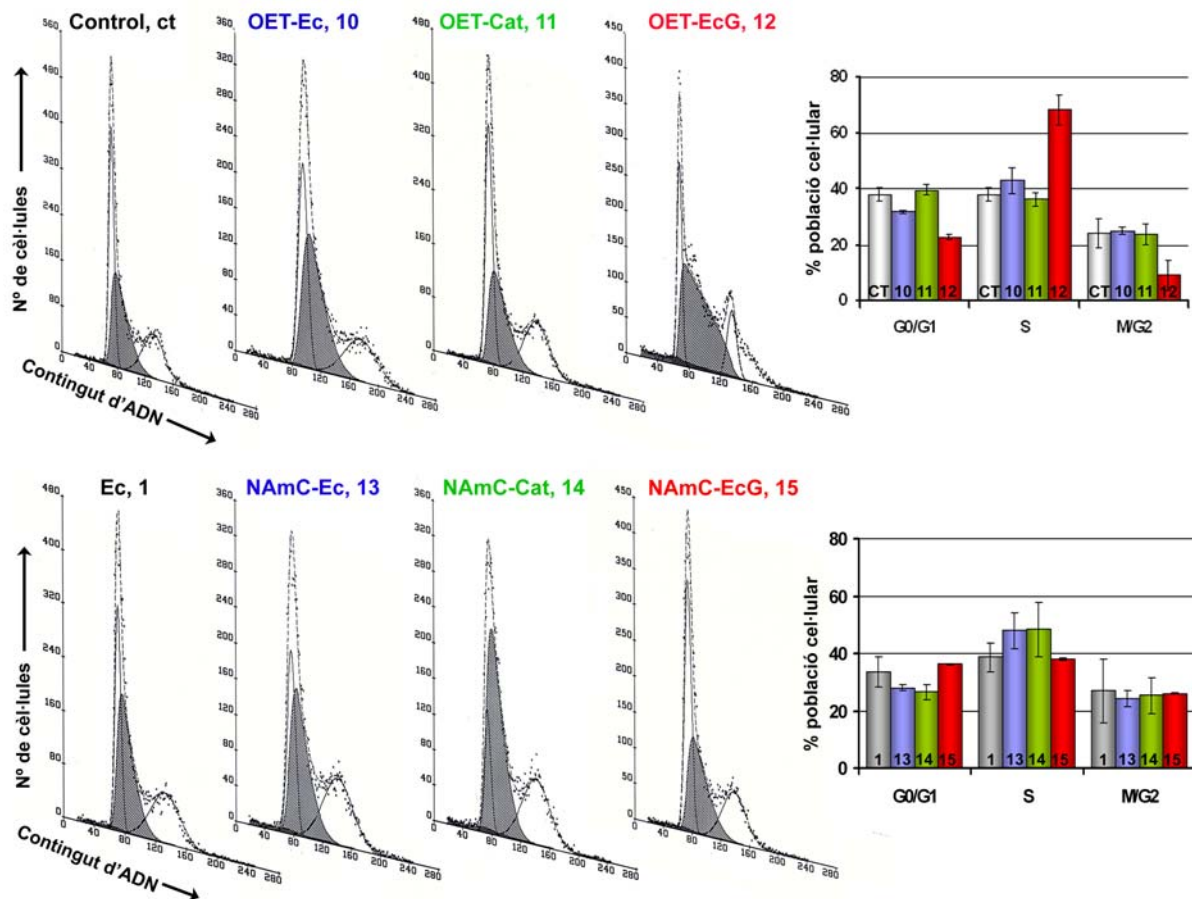


Figura 53. Diagrames de la distribució del cycle cel·lular en la línia HT29. Cèl·lules sense tractar transcorregudes 72 h de incubació (CT) i cèl·lules tractades durant 72 h amb 845 μM de **1** (gris), 272 μM de **10** (blau), 72 μM de **11** (verd), 256 μM de **12** (vermell), 280 μM de **13** (blau) i **14** (verd) i 65 μM de **15** (vermell). La distribució cel·lular es va determinar utilitzant la citometria de flux per FACS i s'expressa com a percentatge de cèl·lules en les diferents fases del cycle: G₁/G₀, S i G₂/M, tal com mostra els diagrames de barres. Els valors mostrats representen la mitja \pm DE per $n \geq 3$ experiments.

En aquest assaig s'ha observat la resposta de les cèl·lules de càncer de colon després de ser tractades durant 72 h amb una concentració corresponent a la IC₅₀ dels conjugats amb OET (**10-12**) i NAmC (**13-15**), juntament amb el monòmer **1**. El conjugat galat **12** generà una alteració significativa en la transició de fases G₁ a S del cycle cel·lular de HT29, mentre que la resta de productes no mostraren cap efecte sobre el cycle cel·lular. Aquest resultat està amb concordància tan amb la literatura com amb els resultats recollits en les línies de melanoma anteriors, on es mostrà també un bloqueig en la transició de G₁ a S. Així doncs aquest bloqueig del cycle cel·lular en la transició G₁ a S és comú en una àmplia diversitat de càncers (Sherr, 1996; Ortega *et al.*, 2002), aquí observat en melanoma i càncer de colon.

Alguns autors suggereixen que el grup pirogal·lol és requerit tant per la capacitat antioxidant com pels efectes antiproliferatius (Salucci *et al.*, 2002). Tot i així, s'ha observat que el conjugat

15 (derivat amb NAmC) que ja mostrà diferències en el seu efecte sobre la viabilitat cel·lular respecte al observat amb la resta de conjugats galats, aquest no ha afectat al cicle cel·lular tot i presentar un grup galat en la seva estructura. L'estructura del conjugat galat **15** s'hauria d'analitzar amb profunditat per tal de veure si presenta alguna característica física especial que emascararia l'efecte que provoca el grup galat, tan a nivell de cicle cel·lular com d'apoptosi (mostrat en el següent apartat).

4.15 CAPACITAT D'INDUIR APOPTOSI DELS FLAVANOLS CONJUGATS AMB OET I NAmC SOBRE LA LÍNIA HT29

S'ha caracteritzat l'efecte dels productes derivats a nivell d'alteració del cicle cel·lular en la línia de càncer de colon. Tal com es feu amb les línies de melanoma, s'ha analitzat també si les alteracions en el cicle cel·lular observades es corresponen amb una inducció de l'apoptosi.

Les cèl·lules HT29 es cultivaren de la mateixa manera que les del melanoma, tal com s'ha descrit en l'apartat 4.12.1, i es tractaren amb els productes derivats **10-15** i el monòmer **1** a concentracions de la seva IC₅₀. Els productes **1** i **11** mostraren un comportament similar a les cèl·lules sense tractar (control), mentre que en les cèl·lules tractades amb el compost **10** el percentatge de cèl·lules apoptòtiques fou el doble que en el control, i en les cèl·lules tractades amb el conjugat **12** el nombre de cèl·lules apoptòtiques fou quatre vegades superior al control (Figura 54). En el cas de les cèl·lules de HT29 tractades amb els derivats de NAmC **13-15**, el percentatge de cèl·lules apoptòtiques fou d'aproximadament el doble del control (Figura 54) i on el derivat galat **15** no mostrà la inducció esperada per un compost que presenta un grup galat en la seva estructura.

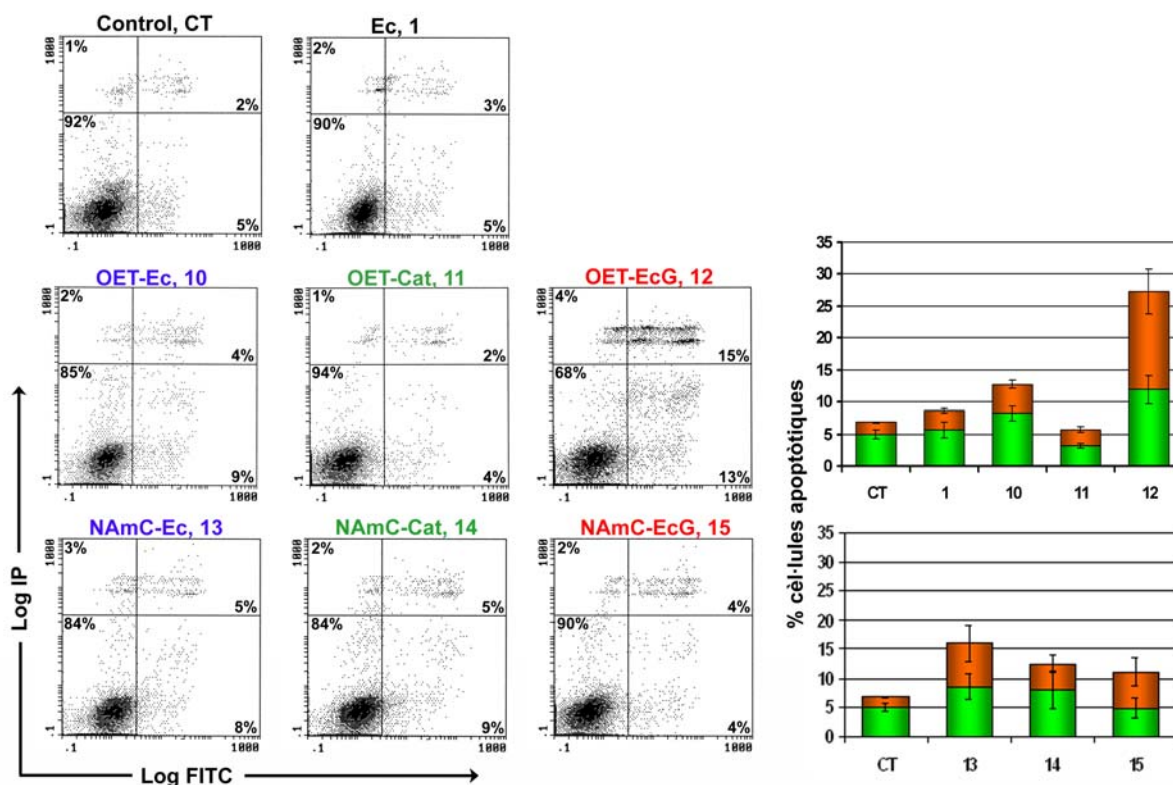


Figura 54. Anàlisi de la distribució cel·lular segons la fluorescència present en cadascuna de les cèl·lules, adquirida en un citofluorímetre de flux (FACS). Els quadrants de Log FITC *versus* Log IP reflexen la distribució de cèl·lules segons presentin tinció per iodur de propidi (IP, eix Y) o per anexina V/FITC (eix X). El diagrama de barres mostra el percentatge de cèl·lules en apoptosi primerenca (color verd, tinció per anexina) i d'apoptosi avançada (color taronja, doble tinció d'anexina i IP) en cèl·lules sense tractar (CT) i en cèl·lules tractades durant 72 h amb 845 μ M de **1**; 272 μ M de **10**; 72 μ M de **11**; 256 μ M de **12**; 280 μ M de **13** i **14**; 65 μ M de **15**. L'anàlisi que es mostra és representatiu de tres experiments independents.

La distribució cel·lular en la línia HT29 un cop tractada amb els conjugats es pogué relacionar amb els resultats obtinguts en les línies de melanoma A375 i M21. Així, els compostos que no presentaven un grup galat en la seva estructura no inflüiren en la inducció de l'apoptosi, mentre que el conjugat galat **12** induí significativament l'apoptosi de la línia cel·lular HT29 multiplicant per cinc el valor obtingut en les cèl·lules sense tractar (control). En canvi, el conjugat galat **15** no generà ni aturada en el cicle cel·lular ni tampoc induí apoptosi.

Aquesta observació es relacionà amb el fet que el conjugat galat **15** fou l'únic compost galat en el test de l'HNTTM que presentà una transferència electrònica baixa, amb un valor similar a aquells compostos que els hi manca el grup galat. Això ens feu pensar en la possibilitat que la inducció a l'apoptosi estigués relacionada amb una elevada capacitat de

transferència electrònica i no tant amb la presència del grup galat, el qual pot ser necessari però no suficient per generar tal inducció. La transferència d'electrons és vital pel correcte funcionament de la maquinaria cel·lular, i els processos més importants es duen a terme dins la mitocondria. Els subproductes d'aquest procés electrònic són molt reactius, pel que ha d'estar tot molt ben regulat. Les espècies reactives d'oxigen (ROS), apart de ser potencialment danyines per l'ADN, són importants reguladors de les funcions cel·lulars, incloent l'apoptosi. Petites quantitats de ROS, com el radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), l'anió superòxid (O_2^-), l'oxigen singlet ($^1\text{O}_2$) i el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), són constantment generades en cèl·lules vives i l'homeòstasi de l'organisme és fortament dependent del correcte equilibri redox (Kovacic *et al.*, 2001; Pelicano *et al.*, 2003). Tot i així, les ROS podrien activar l'apoptosi directament com un agent tòxic contra la cèl·lula o indirectament mitjançant la regulació d'un o més mecanismes d'apoptosi (Wardman, 2001; Wenzel *et al.*, 2004). Entre aquestes espècies, el radical superòxid i no l'hidroxil sembla ser en part responsable de la inducció apoptòtica, tal com s'ha observat en cèl·lules HT29 (Wenzel *et al.*, 2004). A més, hi ha indicis en que la generació dels radicals O_2^- en excés podrien estar relacionats amb l'apoptosi (Wardman, 2001). En el cas dels polifenols, les catequines que contenen trihidròxibenzens com l'EgcG són una font de generació del radical superòxid molt més eficaç que les pròpies catequines, tal com (-)-epicatequina (Khan *et al.*, 1995; Kovacic *et al.*, 2001; Azam *et al.*, 2004) i són capaces d'inhibir el creixement cel·lular a través d'una aturada en el cicle cel·lular i d'inducció a l'apoptosi per mecanismes que involucren el grup galat (Valcic *et al.*, 1996; Alanko *et al.*, 1999; Ahmad *et al.*, 2000a; Jung *et al.*, 2001). Així i de manera concordant amb el que diu la literatura, els resultats presentats en aquest treball mostren conjugats galats tal com CYS-EcG **9** i OET-EcG **12** induint una apoptosi quatre vegades superior a la determinada en les cèl·lules controls corresponents de les línies A375, M21 (veure figures de l'apartat 4.12.1) i HT29 (apartat 4.15.1) i aturant el cicle cel·lular en la fase S (veure figures dels apartats 4.11 per melanoma i 4.14 per càncer de colon). Aquests dos conjugats **9** i **12**, juntament amb l'EgcG **16**, posseeixen una elevada capacitat de transferència electrònica (entre 5 i 6 electrons per molècula). Els derivats **1**, **7-8**, **10-11** i **13-14**, tots mancats de grup galat, mostraren una pobra capacitat de transferència i cap d'ells induí aturada en el cicle cel·lular o apoptosi. Sorprenentment, es va obtenir un conjugat, NAmC-EcG **15**, que tot i presentar un grup galat en la seva estructura no va induir aturada en el cicle cel·lular ni apoptosi. Tanmateix, la transferència electrònica de **15** (2.9 electrons per molècula) fou més

baixa que l'esperada per un compost que conté un grup galat i similar a totes aquelles espècies no gal·loitzades (aproximadament 2 electrons per molècula). Aquest estudi ajuda a d'altres observacions presents en la literatura que relacionen la inducció de l'apoptosi amb la capacitat de transferència electrònica i la formació del radical superòxid, mentre que la presència del grup galat no sembla una condició suficient per induir a l'apoptosi, sinó que en dependrà més de com estigui col·locat en la conformació més estable de la molècula.

Resumint, la despolimerització dels extractes vegetals ha permès l'obtenció d'uns conjugats de flavanols amb unes propietats particulars. Tots els productes han presentat una elevada capacitat antioxidant tant com a donadors d'hidrogen com en transferència electrònica. Entre ells, els conjugats amb el grup galat esterificat foren els més eficaços en ambdós assaigs.

Degut a la capacitat que presenten els flavonoides d'influir en la maquinària de replicació cel·lular, s'avaluaren els nous compostos en línies tumorals de melanoma i càncer de colon. Tots ells presentaren una moderada capacitat per disminuir la proliferació cel·lular, mentre que només els conjugats galats afectaren la distribució del cicle cel·lular de les cèl·lules tumorals aturant la transició G1-S. La fase S del cicle cel·lular està relacionada amb la replicació de l'ADN (síntesi d'ADN, veure apartat 1.3.2 de la Introducció)(Elliott *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2000) i l'aturada del cicle en aquesta fase implica l'activació de senyals apoptòtiques (Evan *et al.*, 2001; Pucci *et al.*, 2000). D'acord amb això, els productes que provocaren una aturada en la fase S del cicle també induïren apoptosi en totes les línies tumorals estudiades (A375, M21 i HT29). Curiosament, en els productes estudiats en el present treball, l'aturada en la fase S i la inducció d'apoptosi semblen estar relacionades amb la capacitat de transferència electrònica més que no pas amb la presència del grup galat. La capacitat de transferència electrònica dels compostos amb grup galat **9** i **12** podria estar directament relacionada amb danys a l'ADN (Jacob *et al.*, 1996; Kovacic *et al.*, 2000), aturada en fase S i apoptosi tal com està descrit pel monòmer majoritari del te EgcG (**16**) mentre que els monòmers sense grup galat (epicatequina, catequina) i el conjugat gal·loitzat **15**, que presenten menor capacitat de transferència electrònica, no generen els efectes cel·lulars. Alternativament, l'absència d'efectes sobre la maquinària cel·lular pel compost **15** podria ser deguda a alguna alteració estructural que li impedeix influir en la síntesi d'ADN i que, a la vegada, afecta la seva capacitat de transferència.

Sigui quina sigui la raó, els resultats obtinguts amb l'assaig de transferència electrònica es relacionen amb la capacitat apoptòtica del producte. Així, l'assaig del HNTTM és un bon indicador per trobar productes potencialment inductors d'apoptosi.