



FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA (FARMÀCIA)

**Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de
fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante
frente a estrés oxidativo en modelos celulares**

Vanessa Ugartondo Casadevall

2009



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FISCOQUÍMICA

PROGRAMA DE DOCTORAT: MEDICAMENTS, ALIMENTACIÓ I SALUT

BIENNI 2004-2006

**Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de
fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante
frente a estrés oxidativo en modelos celulares**

Memòria presentada per Vanessa Ugartondo Casadevall per optar al títol de
doctor per la Universitat de Barcelona

Directores:

M^a Pilar Vinardell Martínez-Hidalgo

Montserrat Mitjans Arnal

Doctoranda:

Vanessa Ugartondo Casadevall

2009



M. Pilar Vinardell Martínez Hidalgo, Profesora Titular de Fisiologia del
Departament de Fisiologia (Farmàcia) de la Universitat de Barcelona

INFORMA:

Que la memoria titulada “Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares” presentada por VANESSA UGARTONDO CASADEVALL para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departament de Fisiologia (Farmàcia), y considerándola finalizada, autorizo su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste, firmo la presente en Barcelona, el día 8 de enero de 2009.

Dra. M.Pilar Vinardell Martínez-Hidalgo



Montserrat Mitjans Arnal Profesora Lectora del Departament de Fisiologia
(Farmàcia) de la Universitat de Barcelona,

INFORMA:

Que la memoria titulada “Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares” presentada por VANESSA UGARTONDO CASADEVALL para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departament de Fisiologia (Farmàcia), y considerándola finalizada, autorizo su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste, firmo la presente en Barcelona, el día 8 de enero de 2009.

Dra. Montserrat Mitjans Arnal

Esta tesis ha sido subvencionada por los proyectos PPQ2003-06602-C04-01 y AGL2006-12210-C03-02/ALI en el marco del Plan Nacional de Investigación y Desarrollo del Ministerio de Educación y Ciencia. Durante su realización, la autora ha disfrutado de una *Beca de Formació en la Recerca i la Docència de la Universitat de Barcelona* (2004) y de una *Beca de Formació de Personal Universitari* (FI) de la Generalitat de Catalunya (2005-2008)

A mis padres y a

mi hermano

Agradecimientos

Realizar este trabajo ha supuesto un reto personal que no habría sido posible si durante todos estos años no hubiese estado rodeada de personas maravillosas que me han apoyado, me han animado, me han reñido y me han retado. Por este motivo, me gustaría expresarles mi agradecimiento a todas ellas:

En primer lugar, quiero agradecerles a mis directoras de tesis, Pilar y Montse, el dejarme ser una "alternativa", por darme su confianza y por ser más amigas que jefas. Pilar, siempre recordaré tu lema "tira pel dret"; Montse, no cambies nunca.

A Lourdes y a Vero, que fueron mi "comité de bienvenida" y en seguida se convirtieron en mis amigas. Gracias por todo lo que me enseñasteis, por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, y por aguantar mis sesiones Flaix FM. Chicas...ios he echado mucho de menos este último año!. Espero conservar siempre vuestra amistad, isois fantásticas!.

A Diana, eres simplemente genial, nunca cambies, y conserva siempre ese sentido del humor, esa generosidad y ese "desconecte" tan encantador que te caracteriza.

A M^a José, por ser mi consejera, enfermera particular y sobre todo, amiga. Gracias por tus locuras y gracias por estar siempre ahí (sobre todo por tus "visitas" de las 15h).

A Raquelilla, nuestra madraza particular. Compartir contigo estos años ha sido todo un placer y tu sonrisa de buenos días, tu compañerismo, tu optimismo y tu carácter, han llenado este duro camino de cuatro años de divertidas y relajadas "zonas de descanso" que nunca olvidaré. ¡Jo!...isi consigues emocionarme y todo!. Carla tiene mucha suerte.

A Francisco, por demostrarme que se puede ser buena persona, buen profesional y buen amigo, todo en el mismo paquete.

A Carolina, no sabes cuánto echaré de menos tus "buenos días Vanesilla". Gracias por tus consejos, tu amistad y por enriquecer mi vocabulario a base de "colombianadas". Recuerdos a Simón.

A Silvia, por ser como eres, por siempre darme ánimos y por nuestras divertidas sesiones de cine.

A Sara y a Tere, por separado sois dos personas increíbles, pero juntas...ino tenéis desperdicio! Sara, si la ciencia no te convence, dedícate al teatro, que tú vales. Tere, entre tú y yo, el aeróbic es más divertido que la tesis, je, je.

Al resto de compañeros del grupo de inmuno, Ana, Emma, Manel Chari, Carme...coincidir con vosotros ha sido todo un placer.

A Jaume, gracias por "compartir" conmigo tus llamadas telefónicas, por tener ese humor tan especial y por seguir hablándonos aunque nos empeñemos en dejarte sin comer.

A Vanessa Alba, por su paciencia, por ser una de las personas más dulces que he conocido y por pasarme clips de contrabando. A Pilar Serrat, por cuadrar siempre las bolsas de viaje (mi cuenta corriente también te lo agradece) y por tener un gran sentido del humor. A Àngels Moscatell por tu simpatía y tu ayuda cuando la he necesitado.

A Cinthia, por ese añito de penas, alegrías y puestas a punto que compartimos. Las células y una servidora siempre te recordaremos con mucho cariño.

Al resto de miembros del Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia por vuestra acogida y amabilidad.

Quiero agradecer a la doctora M^a Antonia Busquets su ayuda y amable predisposición para que el fluorímetro se mostrara "colaborador" con nosotras en todo momento.

A Quim y a Javi por abrirme las puertas de su laboratorio, por su paciencia, por enseñarme lo que es disfrutar trabajando, pero sobre todo, por hacerme reír. Chicos, sois fantásticos.

A Eva M^a y Helena, a las que quiero un montón, con las que he compartido muchos buenos momentos y a las que agradezco sus ánimos, sus broncas y sobre todo, su amistad.

A mis compis de bio, Salva y Albert, por los buenos ratos y las miles de conversaciones absurdas que hemos tenido. Mucha suerte en todo lo que hagáis.

A mis compis del cole, Marta, Sandra, Alexandra...gracias por esos cafés y mensajitos de ánimo.

Pero sobre todo quiero dar las gracias a mis padres y a mi hermano. Mami, gracias por confiar en mí, por hacerme la existencia más fácil y por tener siempre un hombro preparado para mis lágrimas. Papi, gracias por apoyarme en la sombra, sé que a veces es difícil tratar conmigo, y gracias por hacerme heredar tu sentido del humor. Ale, además de mi hermano, eres mi confidente y tu apoyo me ha hecho llegar hasta aquí, gracias. Àurea, gracias por interesarte siempre por mis cosas, mi hermano tiene suerte de tenerte.

A mis abuelos, os adoro.

Al resto de mi familia, especialmente a mi tía Araceli, por darme su apoyo y recordarme siempre que "yo valgo mucho".

A Maxi, por "encontrarme" en mi etapa final de tesis y aún así aguantarme. Gracias por tu paciencia, por tu apoyo y sobre todo, por aguantar mi "variado" menú de cena. Soy muy feliz de tenerte a mi lado. Te quiero.

| | |
|---|----|
| ÍNDICE GENERAL | I |
| ÍNDICE DE FIGURAS | V |
| ÍNDICE DE TABLAS | IX |
| ABREVIATURAS | XI |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Radicales libres y Especies Reactivas | 5 |
| 1.1.1. Definición y clasificación | 5 |
| 1.1.2. Principales fuentes de Radicales Libres | 6 |
| 1.1.2.1. Fuentes endógenas de Radicales Libres | 6 |
| 1.1.2.2. Fuentes exógenas de Radicales Libres | 7 |
| 1.1.3. Daños producidos por los Radicales Libres | 8 |
| 1.1.3.1. Principales dianas biológicas de los Radicales Libres: lípidos de membrana, proteínas y ADN | 10 |
| 1.1.4. Efectos beneficiosos de los Radicales Libres: no podían ser tan malos | 11 |
| 1.2. Antioxidantes | 11 |
| 1.2.1. ¿Qué es un antioxidante? | 11 |
| 1.2.1.1. Actividad antiradicalaria | 12 |
| 1.2.1.2. Caracterización de la actividad antioxidante | 12 |
| 1.2.2. Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> | 13 |
| 1.2.2.1. Métodos químicos | 14 |
| 1.2.2.2. Métodos biológicos | 16 |
| 1.2.2.2.1. El eritrocito | 16 |
| 1.2.2.2.2. Cultivos celulares | 20 |
| 1.2.3. Sistemas de defensa antioxidantes del organismo | 24 |
| 1.2.3.1. Sistemas de defensa antioxidantes endógenos | 24 |
| 1.2.3.1.1. Sistemas enzimáticos | 24 |

| | |
|---|-----|
| 1.2.3.1.2. Sistemas no enzimáticos..... | 25 |
| 1.2.3.1.3. Efecto sinérgico de los antioxidantes | 26 |
| 1.2.3.2. Sistemas de defensa antioxidantes exógenos | 27 |
| 1.3. Estrés oxidativo..... | 29 |
| 1.4. Sustancias polifenólicas..... | 31 |
| 1.4.1. ¿Qué son? ¿Cómo son? ¿Qué hacen? o lo que es lo mismo, Clasificación, propiedades y funciones de los polifenoles | 31 |
| 1.4.2. Los flavonoides, los polifenoles más abundantes | 33 |
| 1.4.2.1. Estructura, clasificación y propiedades biológicas | 34 |
| 1.4.2.2. Actividad antioxidante / prooxidante de los flavonoides... .. | 38 |
| 1.5. Sostenibilidad y reciclaje en la industria agroalimentaria..... | 42 |
| 1.5.1. Productos de alto valor añadido..... | 42 |
| 1.5.2. Derivados de Epicatequina | 43 |
| 1.5.3. Fracciones polifenólicas procedentes de diferentes fuentes vegetales | 44 |
| 2. OBJETIVOS | 47 |
| 3. RESULTADOS | 51 |
| 3.1. Estudio de la actividad biológica de derivados de Epicatequina | 53 |
| Bloque I. Actividad antioxidante y citotoxicidad | 55 |
| - Artículo 1. "Comparative study of the cytotoxicity induced by antioxidant epicatechin conjugates obtained from grape" | 57 |
| Bloque II. Actividad protectora frente al estrés oxidativo inducido por el H ₂ O ₂ | 67 |
| - Artículo 2. "Biobased epicatechin conjugates protect erythrocytes and non tumoral cell lines from H ₂ O ₂ -induced oxidative stress" ... | 69 |
| Bloque III. Interacción de la Epicatequina y sus derivados con la membrana del eritrocito | 99 |
| - Introducción | 101 |

| | |
|---|-----|
| - Material y Métodos | 102 |
| - Resultados y discusión | 106 |
| Bloque IV. Actividad genotóxica de la epicatequina y sus tiol derivados en células 3T3..... | 117 |
| - Introducción | 119 |
| - Material y Métodos | 120 |
| - Resultados y discusión | 122 |
| 3.2. Estudio de la actividad biológica de fracciones polifenólicas de origen natural..... | 131 |
| Bloque I. Actividad antioxidante y citotoxicidad | 133 |
| - Artículo 3. "Comparative antioxidant and cytotoxic effect of procyanidin fractions from grape and pine" | 135 |
| - Artículo 4. "Highly galloylated tannin fractions from witch hazel (<i>Hamamelis virginiana</i>) bark: electron transfer capacity, in vitro antioxidant activity, and effects on skin-related cells" | 145 |
| Bloque II. Actividad protectora frente al estrés oxidativo inducido por el H ₂ O ₂ | 159 |
| - Artículo 5. "Protection against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human erythrocytes and the 3T3 fibroblast cell line by polyphenolic fractions from different sources" | 161 |
| 4. DISCUSIÓN GENERAL | 191 |
| 5. CONCLUSIONES | 213 |
| 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 217 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Agentes oxidantes derivados del metabolismo normal celular | 6 |
| Figura 2. Reacción de Fenton | 7 |
| Figura 3. Daños producidos por los Radicales Libres | 9 |
| Figura 4. Mecanismo de ataque de los RL | 9 |
| Figura 5. Proceso de peroxidación lipídica | 10 |
| Figura 6. Mecanismo antiradicalario de las moléculas antioxidantes | 12 |
| Figura 7. Modelo celular del eritrocito..... | 17 |
| Figura 8. Principales alteraciones producidas en el eritrocito por exposición a RL..... | 18 |
| Figura 9. Modelos celulares <i>in vitro</i> de irritación dérmica | 22 |
| Figura 10. Reacción catalizada por la Superóxido dismutasa (SOD) | 25 |
| Figura 11. Reacciones catalizadas por la enzima Catalasa (CAT) | 25 |
| Figura 12. Reacción catalizada por la Glutación peroxidasa (GPx)..... | 25 |
| Figura 13. Reacción de Haber-Weiss | 26 |
| Figura 14. Efecto sinérgico de las moléculas antioxidantes | 27 |
| Figura 15. Balanza representativa del equilibrio redox..... | 29 |
| Figura 16. Grupo fenol de los polifenoles | 32 |
| Figura 17. Estructura química de los polifenoles | 32 |
| Figura 18. Núcleo flavonoide | 34 |
| Figura 19. Estructura de los flavonoides más comunes en la naturaleza .. | 35 |
| Figura 20. Flavonol quercitina | 35 |
| Figura 21. Flavona luteolina | 35 |
| Figura 22. Flavanona hesperetina..... | 36 |
| Figura 23. Isoflavona genisteína..... | 36 |
| Figura 24. Flavanol epicatequina | 36 |

| | |
|---|-----|
| Figura 25. Flavanol epigallocatequina | 36 |
| Figura 26. Antocianidina cianidina | 37 |
| Figura 27. Mecanismos que son capaces de ejecutar los flavonoides para inhibir los procesos de peroxidación lipídica: quelación de metales o captación de radicales libres | 38 |
| Figura 28. Principales grupos estructurales de la molécula del flavonoide quercitina implicados en el potencial antioxidante | 39 |
| Figura 29. Grupos galato presentes en las moléculas de (-)-epicatequina galato (ECG) y (-)-epigallocatequina galato (EGCG) | 40 |
| Figura 30. Mecanismos prooxidantes de los flavonoides | 41 |
| Figura 31. Procesamiento para la utilización de subproductos industriales..... | 43 |
| Figura 32. Procedimiento de excitación y emisión de la luz fluorescente. Cálculo de la anisotropía de fluorescencia..... | 104 |
| Figura 33. Microscopio electrónico de barrido modelo Hitachi S2300..... | 105 |
| Figura 34. Cubeta de electroforesis y detalle del gel de poliacrilamida .. | 106 |
| Figura 35. Localización de las sondas TMA-DPH y DPH en la membrana celular | 107 |
| Figura 36. Microscopía electrónica de barrido de RBC humanos | 111 |
| Figura 37. Representación esquemática de la hipótesis de la bicapa | 112 |
| Figura 38. Electroforesis mediante SDS-PAGE (7,5%) de las proteínas de membrana de eritrocitos. Efecto del AAPH y diversos flavanoles | 113 |
| Figura 39. Electroforesis mediante SDS-PAGE (7,5%) de las proteínas de membrana de eritrocitos. Efecto del H ₂ O ₂ y diversos flavanoles..... | 114 |
| Figura 40. Fotomicrografías representativas de imágenes de Comet..... | 123 |
| Figura 41. Citotoxicidad celular de la Epicatequina (Ec) en fibroblastos 3T3 | 124 |
| Figura 42. Evaluación de la genotoxicidad de la Epicatequina | 125 |
| Figura 43. Citotoxicidad celular de la Epicatequina (Ec) y de sus tiol derivados en fibroblastos 3T3 | 126 |

Figura 44. Evaluación de la genotoxicidad de la Epicatequina y sus tiol derivados 127

Figura 45. Análisis del daño inducido por el derivado Cys-Epicatequina en el material genético de células 3T3 128

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) fisiológicas | 5 |
| Tabla 2. Principales factores externos que incrementan la producción de ROS | 7 |
| Tabla 3. Sustancias fitoquímicas con actividad antioxidante y algunas fuentes alimentarias naturales de dónde se obtienen..... | 29 |
| Tabla 4. Principales enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo ... | 30 |
| Tabla 5. Anisotropía de fluorescencia de las sondas en estado de equilibrio TMA-DPH y DPH incorporadas a las membranas de los eritrocitos | 108 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|---|
| A· | Especie radical derivada del antioxidante |
| AAPH | 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorido |
| ABTS ^{·+} | (2,2'- azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) |
| ADN | Ácido Desoxiribonucleico |
| AH | Antioxidante |
| AMVN | 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo) |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| BSA | Albúmina Sérica Bovina |
| CAT | Catalasa |
| CI ₅₀ | Concentración Inhibitoria 50 |
| CPh | Ciclofosfamida |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle Medium |
| DPH | 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno |
| DPPH· | 2,2-difenil-1-picrilhidracil |
| Ec | Epicatequina |
| EGC | Epigalocatequina |
| EGCG | Epigalocatequina galato |
| ESM | Error Estándar de la Media |
| FBS | Suero Fetal Bovino |
| FRAP | Ferric-reducing Antioxidant Power |
| FS9 | Activador Metabólico, Fracción S9 |
| GPx | Glutación Peroxidasa |
| GRed | Glutación Reductasa |
| GSH | Glutación |
| GSSG | Glutación oxidado |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrógeno |

Abreviaturas

| | |
|--------------------------|---|
| Hb | Hemoglobina |
| HMW | Proteínas de Elevado Peso Molecular |
| HNTTM | Tris(2,4,6-tricloro-3,5-dinitrofenil)metil |
| HPLC | Cromatografía Líquida de Alta Eficacia |
| ICCVAM | Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods |
| IL-1 α | Interleucina 1 alpha |
| LD ₅₀ | Dosis Letal 50 |
| LDH | Lactato Deshidrogenasa |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| LMW | Proteínas de Bajo Peso Molecular |
| LMWA | Antioxidantes de Bajo Peso Molecular |
| LPO | Peroxidación Lipídica |
| MDA | Malondialdehído |
| mDP | Grado medio de polimerización |
| Met-Hb | Metahemoglobina |
| MTT | 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio |
| NADPH | Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato |
| NHK | Queratinocitos humanos normales |
| NO \cdot | Óxido Nítrico |
| NR | Colorante Rojo Neutro |
| NRR | Ensayo de Liberación del Colorante Rojo Neutro |
| NRU | Ensayo de Captación del Colorante Rojo Neutro |
| O ₂ \cdot^- | Anión Superóxido |
| \cdot OH | Radical Hidroxilo |
| ORAC | Oxygen Radical Absorbance Capacity |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos |
| PUFA | Ácidos Grasos Poliinsaturados |
| R \cdot | Especie radical |

| | |
|------------------|--|
| RBC | Eritrocitos o Glóbulos Rojos |
| RH | Radical estable derivado de la especie radical |
| RL | Radical libre |
| RS | Especie Reactiva |
| RBrS | Especies Reactivas del Bromo |
| RCIS | Especies Reactivas del Cloro |
| RNS | Especies Reactivas del Nitrógeno |
| ROO [·] | Radical Peroxilo |
| ROS | Especies Reactivas del Oxígeno |
| SEM | Microscopía Electrónica de Barrido |
| SDS | Dodecil Sulfato Sódico |
| SOD | Superóxido Dismutasa |
| TBA | Ácido Tiobarbitúrico |
| TBARs | Especies Reactivas del Ácido Tiobarbitúrico |
| TCA | Ácido Tricloroacético |
| TEAC | Trolox Equivalent Antioxidant Capacity |
| TMA-DPH | 1-(4-feniltrimetilamonio)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno |
| TOSC | Total Oxyradical Scavenging Capacity |
| TRAP | Total Radical-trapping Parameter |
| UV | Luz Ultravioleta |

