

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE
PRODUCTES NATURALS, BIOLOGIA VEGETAL I EDAFOLOGIA

**ESTUDI I CARACTERITZACIÓ DE METABÒLITS SECUNDARIS:
COMPOSTOS FENÒLICS I ALCALOIDES**

LAURA TORRAS CLAVERIA
2007

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE
PRODUCTES NATURALS, BIOLOGIA VEGETAL I EDAFOLOGIA

Programa de doctorat: MEDICAMENTS, ALIMENTACIÓ I SALUT

BIENNI 2003-2005

ESTUDI I CHARACTERITZACIÓ DE METABÒLITS SECUNDARIS: COMPOSTOS
FENÒLICS I ALCALOIDES

Memòria presentada per Laura Torras Claveria per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Els directors,

La doctoranda,

Dr. Francesc Viladomat
Meya
Facultat de Farmàcia
Universitat de Barcelona

Dr. Jaume Bastida
Armengol
Facultat de Farmàcia
Universitat de Barcelona

Laura Torras Claveria

LAURA TORRAS CLAVERIA
2007

AGRAÏMENTS

Són moltes les persones a les quals haig d'agrair la seva ajuda, suport, dedicació i paciència perquè finalment hagi aconseguit arribar fins aquí i escriure aquesta tesi doctoral.

En primer lloc, haig d'agrair als meus directors de tesi, el Dr. Jaume Bastida i el Dr. Francesc Viladomat, que m'hagin donat l'oportunitat de realitzar la tesi doctoral, que hagin cregut en mi, que m'hagin transmès els seus coneixements, que hagin estat disponibles en tot moment a totes les meves qüestions, problemes i preguntes. També els vull agrair la seva paciència, els seus consells, la seva amistat i tots els bons moments que he viscut al laboratori, on m'he sentit com a casa i he treballat realment a gust. També voldria agrair al Dr. Carles Codina la seva disposició i la seva ajuda sempre que l'he necessitat.

En segon lloc, es mereix un gran agraïment la Dra. Olga Jáuregui, per haver-me introduït al món de l'espectrometria de masses i per ensenyar-me a defensar-me davant un triple quadrupol, però també, i sobretot, pels seus consells, dedicació i confiança.

Haig d'agrair, també, a la Irene tots els seus ensenyaments sobre els antioxidants i les extraccions de compostos, sense els quals no hagués pogut realitzar gran part d'aquest treball de tesi.

Mereixen un especial reconeixement tot el Grup de Recerca de Poliamines. El Dr. Antonio Fernández Tiburcio i la Dra. Teresa Altabella, per tota la seva ajuda, supervisió, consells i indicacions, que han estat de gran utilitat. Però també el Rubén, el Juan i la Karen, que m'han ensenyat a treballar amb *Arabidopsis thaliana*, i a qui dec un gran agraïment.

I would also like to thank Strahil Berkov for all his help, cooperation and willingness to share his knowledge. I am truly grateful that I have had the chance to learn from the person who knows more in the world about the analysis of Amaryllidaceae alkaloids through GC-MS.

També voldria expressar el meu agraïment a l'Asun i a l'Ana Linares, per la seva bona disposició i paciència davant les meves consultes.

Així mateix, vull donar les gràcies a tots els companys i amics que han passat pel laboratori que, d'una manera o altra, han contribuït a la realització d'aquesta tesi, de forma directa, o bé amb el seu suport, consells i amistat, i amb qui he passat molt bones estones. A la Gloria, a l'Edison, a la Susana, a la Mariangela, a la Irena, a la Marie Therèse, a la

Maria, al Camille, al JJ, al Ricardo, a la Michela, a la Maria (Luisa), al Jean i especialment a l'Eva, per haver-me transmès el seu esperit lluitador i la seva empenta, i per tots els seus consells que m'han estat molt útils. Però també als "de darrera", a la Marta, a l'Òscar i a la Susanna.

També voldria expressar un agraïment molt especial a la Teresa Gili, per haver fet que en tots aquests anys dedicats a la ciència no oblidés en cap moment que l'art és una part essencial de la vida sense la qual no seríem els mateixos.

A tots els meus amics els dedico un efusiu agraïment, per estar sempre al meu costat, per recolzar-me, per haver compartit amb mi les desgràcies i les alegries, per haver-me escoltat i animat quan estava estressada i deprimida, i per ser qui són i com són. No canviu mai. L'Ívet i la Carolina són, potser, les que millor m'han comprès ja que estan vivint la meva mateixa situació, i qui des d'aquí animo a acabar la seva tesi. Però també haig d'agrair especialment a la Blanca tot el seu suport lingüístic des de Berlín.

Finalment em queda un agraïment molt important, als meus pares. Per haver-me guiat al llarg de la vida, per haver-me transmès el seu interès pel món de la ciència, per haver cregut en mi, per haver-me donat suport, per haver aguantat els meus mals humors i les meves crisis informàtiques (que com sempre a casa nostra són apoteòsiques), per haver-me donat confiança i seguretat. En fi, per tot. No m'oblido, però, de la meva germana, que és la millor amiga que podria tenir des de sempre, ni de la meva súper àvia, que és la millor àvia del món.

I al Carles si que li haig d'agrair coses! No acabaria mai! Des dels seus dissenys i habilitats pel Photoshop, fins la seva comprensió, atenció, afecte i paciència infinita.

A TOTS us agraeixo, de debò, que hagueu estat al meu costat.

MOLTES GRÀCIES!!

laura
Desembre, 2007

ÍNDEX

Breu introducció a la metabolòmica i presentació

Objectius

Publicacions i contribucions a congressos

Abreviatures

1.- INTRODUCCIÓ

1.1.- Compostos fenòlics.....	1
1.1.1.- Concepte.....	1
1.1.1.1.- Diversitat estructural.....	1
1.1.2.- Biosíntesi dels compostos fenòlics.....	7
1.1.2.1.- Ruta dels siquimat-fenilpropanoides.....	8
1.1.2.2.- Ruta de l'acetat-malonat.....	9
1.1.2.3.- Ruta mixta.....	10
1.1.3.- Els compostos fenòlics i la seva importància com a antioxidants.....	12
1.1.3.1.- Els radicals lliures i les espècies reactives d'oxigen.....	12
1.1.3.1.1.- Concepte de radical lliure.....	12
1.1.3.1.2.- Concepte d'espècie reactiva d'oxigen (ROS).....	12
1.1.3.1.3.- Breu descripció de les ROS més significatives.....	13
1.1.3.2.- Estrès oxidatiu.....	19
1.1.3.2.1.- Definició d'estrès oxidatiu.....	19
1.1.3.2.2.- Efectes perniciosos de l'estrès oxidatiu.....	20
1.1.3.2.3.- Malalties i disfuncions orgàniques relacionades amb l'estrès oxidatiu.....	23
1.1.3.3.- Mecanismes de defensa davant l'estrès oxidatiu.....	23
1.1.3.3.1.- Els antioxidants.....	23
1.1.3.3.2.- Tipus i fonts naturals d'antioxidants (el sistema antioxidant).....	24
1.1.3.4.- Relacions d'estructura-activitat antioxidant dels compostos fenòlics.....	31
1.1.4.- Els compostos fenòlics i el seu paper biològic a les plantes.....	33
1.1.4.1.- Els compostos fenòlics i l'estrès oxidatiu a les plantes.....	35
1.1.4.1.1.- Paper dels compostos fenòlics en la senescència.....	37
1.1.4.1.2.- Estrès biòtic i les ROS a les plantes.....	38
1.1.4.1.3.- Estrès abiòtic i les ROS a les plantes.....	40
1.1.4.1.4.- El paper dels compostos fenòlics en l'estrès biòtic i abiòtic.....	43
1.1.4.2.- Els compostos fenòlics i les poliamines.....	44
1.1.4.2.1.- Concepte, metabolisme i funció de les poliamines.....	44
1.1.4.2.2.- Els conjugats de poliamines amb àcids hidroxicinàmics. Característiques i funció.....	49

1.2.- Alcaloides	52
1.2.1.- Generalitats dels alcaloides.....	52
1.2.1.1.- Concepte d'alcaloide.....	52
1.2.1.2.- Classificació.....	54
1.2.2.- Alcaloides de les Amaryllidaceae.....	55
1.2.2.1.- Característiques generals.....	55
1.2.2.2.- Classificació i biosíntesi.....	56
1.2.2.3.- Accions farmacològiques.....	58

2.- MATERIAL I MÈTODES

2.1.- Obtenció del material vegetal	63
2.1.1.- <i>Lavandula x intermedia</i> Emeric ex Loiseleur, Lamiaceae (lavandí).....	63
2.1.2.- <i>Nicotiana tabacum</i> L., Solanaceae (tabac).....	65
2.1.3.- <i>Arabidopsis thaliana</i> L. (Heynh.), Brassicaceae.....	66
2.1.4.- <i>Crinum humile</i> Herb., Amaryllidaceae.....	69
2.1.5.- <i>Pancratium canariense</i> Ker Gawler, Amaryllidaceae.....	70
2.2.- Mètodes extractius	72
2.2.1.- Consideracions generals.....	72
2.2.2.- Extracció de compostos fenòlics de lavandí.....	72
2.2.3.- Extracció de compostos fenòlics i derivats conjugats amb poliamines de tabac i d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
2.2.4.- Extracció de flavans de <i>Crinum humile</i>	74
2.2.5.- Extracció d'alcaloides de <i>Pancratium canariense</i>	74
2.3.- Fraccionament i purificació dels extractes de lavandí, <i>Crinum humile</i> i <i>Pancratium canariense</i>	74
2.3.1.- Cromatografia de líquids al buit.....	74
2.3.2.- Cromatografia de gel-filtració.....	75
2.3.3.- Monitorització per cromatografia en capa fina (TLC).....	75
2.4.- Tècniques d'identificació de compostos	76
2.4.1.- Cromatografia de líquids d'alta resolució acoblada a DAD (HPLC-DAD).....	76
2.4.2.- Espectrometria de masses (MS).....	77
2.4.2.1.- Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS).....	82

2.4.2.2.- Cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS).....	83
2.4.2.3.- Cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses amb detector TOF (LC-MS-TOF).....	85
2.4.3.- Ressonància magnètica nuclear (NMR).....	86
2.4.4.- Espectroscòpia d'infraroig (IR).....	86
2.4.5.- Dicroïsme circular (CD).....	87
2.5.- Quantificació de compostos fenòlics.....	87
2.5.1.- Quantificació dels àcids rosmarínic i clorogènic en el lavandí.....	87
2.5.2.- Quantificació de derivats de compostos fenòlics en el tabac.....	88
2.5.2.1.- Quantificació relativa per normalització interna per LC-MS/MS.....	88
2.5.2.2.- Quantificació de l'àcid neoclorogènic i la rutina per HPLC-DAD mitjançant una corba de calibratge.....	89
2.5.2.3.- Quantificació de conjugats de putrescina amb àcids hidroxicinàmics per LC-MS/MS mitjançant una corba de calibratge.....	90
2.6.- Avaluació del contingut total en compostos fenòlics i de l'activitat antioxidant de les diferents fraccions de l'extracte del lavandí.....	91
2.6.1.- Determinació del contingut total en compostos fenòlics (TPhC) pel mètode de Folin-Ciocalteu.....	91
2.6.2.- Determinació de l'activitat antioxidant.....	94
2.6.2.1.- Determinació de la capacitat captadora del radical DPPH'	95
2.6.2.2.- Determinació de la capacitat captadora del radical 'OH pel mètode de quimioluminescència del luminol induïda per Co(II)/EDTA.....	97
2.6.2.3.- Determinació de la capacitat captadora del radical O ₂ ^{•-} pel mètode del nitro-blue tretazolium (NBT ²⁺) i el sistema hipoxantina/ <i>xantina-oxidasa</i>	100

3.- RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1.- Lavandí.....	103
3.1.1.- Extracció i fraccionament.....	103
3.1.2.- Contingut total en compostos fenòlics (TPhC) i activitat antioxidant.....	103
3.1.3.- Identificació de compostos fenòlics per LC-MS/MS.....	104
3.1.3.1.- Àcids benzoics i hidroxicinàmics, i derivats hidroxicinamoïlquínics.....	105
3.1.3.2.- Glucòsids d'àcids hidroxicinàmics.....	106
3.1.3.3.- Flavonoides.....	107

3.1.4.- Relacions d'estructura-activitat antioxidant dels compostos identificats.....	111
3.1.5.- Quantificació dels àcids clorogènic i rosmarínic.....	111
3.2.- Tabac.....	112
3.2.1.- Identificació de compostos fenòlics per LC-MS/MS.....	112
3.2.1.1.- Àcids hidroxicinamoilquínics.....	113
3.2.1.2.- Glucòsids d'àcids benzoics i hidroxicinàmics.....	115
3.2.1.3.- Flavonoides.....	115
3.2.1.4.- Amides d'àcids hidroxicinàmics (HCAA).....	116
3.2.2.- Quantificació dels derivats d'àcids benzoics i hidroxicinàmics, dels flavonoides, i de les amides d'àcids hidroxicinàmics (HCAA).....	118
3.3.- <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	121
3.3.1.- Identificació de compostos fenòlics per LC-MS/MS.....	121
3.4.- <i>Crinum humile</i>.....	125
3.4.1.- Identificació dels compostos aïllats CHU1 i CHU2 per tècniques de NMR i CD.....	125
3.4.1.1.- 7-Hidroxi-3',4'-metilendioxi flavà (CHU1).....	125
3.4.1.2.- 3-Hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxi flavà (CHU2).....	127
3.4.2.- Presència de flavans en el gènere <i>Crinum</i>	128
3.5.- <i>Pancratium canariense</i>.....	129
3.5.1.- Identificació d'alcaloides de les Amaryllidaceae per GC-MS.....	129

4.- CONCLUSIONS

5.- BIBLIOGRAFIA

6.- ANNEX

BREU INTRODUCCIÓ A LA METABOLÒMICA I PRESENTACIÓ

El terme metaboloma ha sorgit recentment per definir el conjunt de metabòlits sintetitzats per un organisme, si bé, tal com passa amb altres termes com proteoma i transcriptoma, pot aplicar-se a diferents nivells de complexitat, que van des d'organismes, teixits o cèl·l·les, fins a compartiments cel·lulars. Així, la metabolòmica podria definir-se com l'estudi dels metabòlits d'un organisme o de parts d'ell. D'altra banda, però, es parla també d'altres termes que, si bé moltes vegades s'utilitzen com a sinònims, no tenen exactament el mateix significat. Quan es parla de *target analysis* es refereix a l'estudi dels metabòlits resultants d'un enzim en concret, de manera que es poden eliminar tots els altres i disminuir, així, les interferències. El terme *metabolite profiling* (o definició del perfil metabòlic) s'aplica quan l'estudi s'amplia als metabòlits que intervenen en una ruta metabòlica sencera i en les diferents branques relacionades. Només es podria parlar de metabolòmica quan s'estudien tots els metabòlits d'una entitat orgànica, en que s'intenta evitar l'exclusió de qualsevol compost. Finalment, quan s'estudia un ampli ventall de mostres i no és necessari determinar la identitat de cada metabòlit individual, es parla de *metabolic fingerprinting*. Aquests termes, però, sovint es barregen, i moltes vegades s'engloben dins el terme metabolòmica (Fiehn, 2002).

Fins avui, l'estudi dels metabòlits s'ha portat a terme mitjançant tècniques de ressonància magnètica nuclear (NMR) i d'espectrometria de masses (MS). La tècnica de NMR té l'avantatge que s'ha utilitzat durant molts anys, de manera que ha estat intensament validada. A més, es tracta d'una tècnica que permet recuperar la mostra, fet que pot ser determinant en certs casos. D'altra banda, però, presenta els inconvenients de tenir una sensibilitat i resolució baixes, i de només ser aplicable als productes que es troben en una major proporció. La introducció de la MS a l'estudi metabòlic és més recent, i el seu acoblament a la cromatografia de gasos i a la cromatografia de líquids ha fet possible l'anàlisi d'un ampli ventall de metabòlits a la vegada (Ferne *et al.*, 2004; Saghatelian & Cravatt, 2005). La tècnica d'espectrometria de masses acoblada a cromatografia de gasos (GC-MS) fa més temps que s'utilitza per la determinació del perfil metabòlic, i per tant, existeixen protocols estables per a la posada a punt i manteniment dels aparells, la preparació de les mostres, la realització de les anàlisis, l'avaluació dels cromatogrames i la interpretació de les dades. En canvi, la utilització de la cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses (LC-MS) és més recent i no s'ha adquirit tanta experiència, de manera que encara no es disposa de protocols prou validats, i es necessita més temps en la interpretació de les dades. Tot i així, presenta una sèrie d'avantatges respecte la GC-MS, com ara que és aplicable a un ventall més ampli de molècules (la GC-MS només és aplicable

a compostos volàtils, o bé que poden esdevenir volàtils per derivatització), és molt útil en la detecció de rutina de drogues, es pot portar a terme en mescleres complexes, i no apareixen residus fruit de les reaccions de derivatització. A més, la combinació en tàndem (LC-MS/MS) augmenta encara més la sensibilitat i l'especificitat de les anàlisis. Així, es poden detectar tot tipus de metabòlits secundaris, com ara alcaloides, flavonoides, glucosinolats, isoprens, saponines, etc (Fernie *et al.*, 2004; Saghatelian & Cravatt, 2005).

En algunes ocasions, la presència o absència d'un determinat metabòlit és suficient per a la validesa d'un resultat (com en la detecció de drogues); però, en els estudis de metabolòmica, les anàlisis quantitatives són habitualment necessàries. En aquests casos, les dades són sovint expressades com a ràtio respecte un compost control o una mostra control. Altres vegades, però, és necessària una quantificació absoluta d'un o d'uns quants metabòlits determinats, per la qual resulta d'utilitat la disponibilitat de substàncies estàndard de referència i la utilització d'eines estadístiques (Fernie *et al.*, 2004).

Tot i els grans avenços que s'han portat a terme en el camp de la metabolòmica, encara es tracta d'un tipus d'estudi relativament recent, i presenta dos problemes fonamentals. D'una banda, un organisme procariota com l'*Escherichia coli* pot sintetitzar fins a 750 metabòlits diferents, però els organismes eucariotes del Regne Vegetal en poden sintetitzar de 4.000 a 20.000. Així, resulta impossible, fins al moment, disposar d'un mètode d'extracció que no negligèixi cap metabòlit. D'altra banda, tot i que es poden detectar molts compostos a la vegada, s'ha estimat que en una anàlisi per GC-MS típica, només es poden identificar sense ambigüitat d'un 20 a un 30% dels pics detectats.

Actualment, la mesura dels metabòlits té un gran interès, ja que formen part de les rutes bioquímiques, tenen funcions reguladores, intervenen en patologies tant animals com vegetals, poden ser marcadors diagnòstics, etc. De fet, aquest últim punt és l'aplicació més freqüent de la metabolòmica i el camp on més ràpidament s'ha estès, ja que la detecció, identificació i quantificació de metabòlits és clau en la diagnosi de malalties i en el seguiment d'un tractament farmacològic. Els metabòlits també són importants per les seves funcions reguladores, com a components de rutes bioquímiques i com a productes finals de reaccions enzimàtiques. Així, la seva combinació amb la genòmica i la proteòmica resulta de gran utilitat en l'assignació de funcions genètiques i enzimàtiques. També són claus en l'estudi de les interaccions entre diferents sistemes, ja siguin entitats orgàniques o teixits, o bé organismes sencers. Tenint en compte que qualsevol sistema biològic està definit per la seva composició metabòlica, la importància de la metabolòmica serà decisiva en el futur (Fernie *et al.*, 2004).

OBJECTIUS

L'objectiu del present treball de tesi és una aproximació a l'estudi metabòlic de diferents plantes, emprant diferents estratègies i tècniques en funció de l'objectiu particular plantejat en cadascuna de les espècies estudiades.

Dins la gran varietat de metabòlits secundaris de les plantes, s'han triat, per la seva especial rellevància, dos tipus de compostos, els compostos fenòlics i els alcaloides (en concret, els alcaloides de les Amaryllidaceae). Els compostos fenòlics (particularment els àcids benzoics i hidroxicinàmics, i els flavonoides) tenen una gran importància com a substàncies bioactives, ja que són responsables d'un ampli ventall de funcions biològiques dins la planta, i al mateix temps, gràcies a la seva activitat antioxidant, poden exercir nombrosos efectes beneficiosos en el camp de l'alimentació i la farmacologia. De la mateixa manera, els alcaloides de les Amaryllidaceae, que també tenen una gran importància biològica en les plantes d'aquesta família, constitueixen un tipus d'alcaloides amb moltes activitats farmacològiques i de gran interès en l'elaboració de fàrmacs, com per exemple la utilització de la galantamina en el tractament de la malaltia de l'Alzheimer.

Així, s'han realitzat estudis de tipus metabòlic en diferents espècies vegetals, mitjançant l'aplicació de diferents tècniques com ara GC-MS, LC-MS/MS, LC-MS-TOF, i NMR. Dins el gran ventall de possibilitats i aplicacions de la metabolòmica, el treball d'aquesta tesi s'ha centrat en els següents aspectes:

- Estudi de l'activitat antioxidant del material de rebuig del lavandí després de la destil·lació dels seus olis essencials, i identificació dels compostos fenòlics responsables d'aquesta activitat, relacionant, a més, l'estructura d'aquestes molècules amb el tipus d'activitat antioxidant que porten a terme. Aquest objectiu concret s'engloba dins la recerca de noves fonts d'antioxidants naturals fent ús de material vegetal de rebuig.
- Estudi del paper dels compostos fenòlics en la resposta de les plantes davant l'estrès abiòtic i la senescència, a través de la identificació i comparació qualitativa i quantitativa d'aquests metabòlits en diferents mostres de plantes de tabac i d'*Arabidopsis thaliana*.
- Aïllament, identificació i caracterització de flavonoides de *Crinum humile*, espècie vegetal poc coneguda del Camerun.

- Identificació dels alcaloides de les Amaryllidaceae de *Pancratium canariense*, espècie poc estudiada en termes de composició química, amb especial atenció a la possible detecció de nous derivats de la galantamina, compost amb activitat anticolinesteràsica, utilitzat pel tractament de la malaltia de l'Alzheimer.

El present treball de tesi no pretén, però, ser una anàlisi metabòmica completa d'un seguit de plantes, sinó una contribució a la metabòmica, una petita mostra de la gran varietat de possibilitats de la seva aplicació, i una aportació d'una sèrie de resultats que poden ser útils, tant en el camp de la recerca de la bioquímica vegetal, com en el camp de la farmacologia i la fitoquímica.

Torras-Claveria L., Jáuregui O., Bastida J., Codina C., Viladomat F. (2007). **Antioxidant activity and phenolic composition of Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur) waste.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 8436-8443.

Torras-Claveria L., Jáuregui O., Bastida J., Codina C., Viladomat F. (2007). **Actividad antioxidante y composición fenólica del material de desecho del lavandín (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur).** *XVI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina (SILAE)*, 4-8 setembre 2007, La Plata, Argentina.

Torras-Claveria L., Berkov S., Viladomat F., Codina C., Bastida J. (2007). **Alcaloides de *Pancreatium canariense*.** *X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal (Sociedad Española de Fisiología Vegetal)*, 18-21 setembre 2007, Alcalá de Henares, Espanya.

Torras-Claveria L., Jáuregui O., Bastida J., Codina C., Viladomat F. (2007). **Antioxidant activity and phenolic composition of Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur) waste.** *I Workshop de la Sociedad Española de Espectrometría de Masas*, 17-19 octubre 2007, Granada, Espanya.

ABA	Àcid abscísic	EAA1	Extracte alcaloïdic amb EtOAc sec de <i>Pancreatium canariense</i>
AC	Mostra d' <i>Arabidopsis</i> control	EAA2	Extracte alcaloïdic amb EtOAc/MeOH sec de <i>Pancreatium canariense</i>
ACC	<i>Acetil-CoA-carboxilasa</i>	EAE	Extracte de EtOAc sec de lavandí
ACN	Acetonitril	EAq	Extracte aquós sec de lavandí
ADC	<i>Arginina-descarboxilasa</i>	EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
ADC2	Mostra d' <i>Arabidopsis</i> amb sobreexpressió del gen <i>ADC2</i>	EHx	Extracte d'hexà sec de lavandí
AE	Mostra d' <i>Arabidopsis</i> amb estrès hídric	EI	Impacte electrònic
AH	Antioxidant antiradicalari	ESI	Electrosprai
AIA	Àcid indol-3-acètic	EtO ₂	Dietil èter
AIH	<i>Agmatina-iminohidrolasa</i>	EtOAc	Acetat d'etil
ANR	<i>Antocianidina-reductasa</i>	eV	Electronvolts
ANS	<i>Antocianidina-sintetasa</i>	Fe ²⁺	Ió ferrós
APCI	Ionització química a pressió atmosfèrica	FeCl ₃	Clorur fèrric
APX	<i>Ascorbat-peroxidasa</i>	F3H	<i>Flavanona-3-hidroxilasa</i>
BHA	Butilhidroxianisol	F3'H	<i>Flavonoid-3'-hidroxilasa</i>
br d	Doblet ample	FLS	<i>Flavonol-sintetasa</i>
br s	Singlet ample	FNS	<i>Flavona-sintetasa</i>
br t	Triplet ample	FW	Pes fresc
°C	Graus centígrads	g	Grams
CAR	β-Carotè	g	Força centrífuga relativa (RCF) en unitats de gravetat
C-C	Enllaç carboni-carboni	GABA	Àcid γ-aminobutíric
CD	Dicroïsme circular	GAE	Equivalents d'àcid gàlic
CDCl ₃	Cloroform deuterat	GC	Cromatografia de gasos
CE	Energia de col·lisió	GC-MS	Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses
4CL	<i>4-Cumaroil-CoA-ligasa</i>	GPX	<i>Glutatió-peroxidasa</i>
C3H	<i>Cumarat-3-hidroxilasa</i>	GR	<i>Glutatió-reductasa</i>
C4H	<i>Cinamat-4-hidroxilasa</i>	GSH	Glutatió reduït
CHCl ₃	Cloroform	GSSG	Glutatió oxidat
CHI	<i>Xalconaflavanona-isomerasa</i>	3GT	<i>Antocianidina-3-glucosiltransferases</i>
CHS	<i>Xalcona-sintetasa</i>	¹ H-NMR	NMR de protó
CHU1	Compost aïllat de la cromatografia de líquids al buit de l'extarcte CHUS de <i>Crinum humile</i>	HCAA	Amides d'àcids hidroxicànemics
CHU2	Compost aïllat de la cromatografia de líquids al buit de l'extarcte CHUS de <i>Crinum humile</i>	HCOOH	Àcid fòrmic
CHUS	Extracte net i sec de <i>Crinum humile</i>	HeLa	Línia cel·lular derivada de carcinoma de cèrvix humana
CI	Ionització química	HepG2	Línia cel·lular derivada d'hepatoma humana
CID	Dissociació induïda per col·lisió	HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> ¹ H- ¹³ C
CL	Assaig de químioluminescència	H ₂ O	Aigua
cm	Centímetres	H ₂ O ₂	Peròxid d'hidrogen
¹³ C-NMR	NMR de carboni 13	HOAc	Àcid acètic
C-O	Enllaç carboni-oxigen	HOCl	Àcid hipoclorós
COMPT	<i>Cafeoat-3-O-metiltransferasa</i>	HPLC	Cromatografia de líquids d'alta resolució
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i> ¹ H- ¹ H	HPLC-DAD	Cromatografia de líquids d'alta resolució amb detector de DAD
d	Doblet	HR	Resposta hipersensible
dd	Doblet de doblets	H ₂ SO ₄	Àcid sulfúric
ddd	Doble doblet de doblets	HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i> ¹ H- ¹³ C
dddd	Doble doblet de doblets de doblets	HT	Línia cel·lular derivada de carcinoma de vesícula urinària
2D NMR	Ressonància magnètica nuclear bidimensional	Hz	Herts
DAD	Detectors en sèrie de diodes	IC ₅₀	Concentració inhibidora 50
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>	IR	Infraroig
DFMA	Difluormetilarginina	IFS	<i>Isoflavona-sintetasa</i>
DFMO	Difluormetilornitina	J	Constant d'acoblament químic
DFR	<i>Dihidroflavonol-4-reductasa</i>	Kg	Kilogram
DHA	Dehidroascorbat	K-ras-NRK	Cèl·lules de ronyó de rata transformades amb el virus del sarcoma murí de Kirstein
DHAR	<i>DHA-reductasa</i>	LAR	<i>Leucoantocianidina-reductasa</i>
DNA	Àcid desoxiribonucleic		
DP	<i>Declustering potential</i>		
DPPH·	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil hidratat		
DW	Pes sec		
E1	Extracte metanòlic sec de lavandí		

LC-ESI-MS/MS	Cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses en tàndem amb ionització per ESI	PTFE	Politetrafluoretilè
LC-MS/MS	Cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses en tàndem	PUFA	Àcid gras poliinsaturat
LC-MS-TOF	Cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses amb detector TOF	<i>PutHT</i>	<i>Putrescinahidroxicinamoil-transferasa</i>
<i>LDC</i>	<i>Lisina-descarboxilasa</i>	Q	Quadrupol
LDL	Lipoproteïnes de baixa densitat	RI	Índex de retenció
LMTK	Fibroblasts murínics alveolars no tumorals	RNA	Àcid ribonucleic
LNCaP	Línia cel·lular derivada de carcinoma de pròstata humà	ROS	Espècie reactiva d'oxigen
LO [·]	Radical alcoxil	RPLC	Cromatografia de líquids en fase invertida
LOO [·]	Radical peroxil	rpm	Revolucions per minut
LOOH	Hidroperòxid lipídic	s	Segons
m	Metres	<i>s</i>	Singlet
M	Molar	SAM	<i>S</i> -adenosilmetionina
MAE	Extracció assistida per microones	<i>SAMDC</i>	<i>S</i> -adenosilmetionina-descarboxilasa
MDHA	Monodehidroascorbat	SAR	Resistència sistèmica adquirida
<i>MDHAR</i>	<i>MDHA-reductasa</i>	SD	Desviació estàndard
MeOH	Metanol	<i>SOD</i>	<i>Superòxid-dismutasa</i>
mg	Mil·ligrams	<i>SpdHT</i>	<i>Espermidinahidroxicinamoil-transferasa</i>
min	Minuts	<i>SpdS</i>	<i>Espermidina-sintasa</i>
mL	Mil·lilitres	SPE	Extracció de fluids en estat supercrític
mm	Mil·límetres	<i>SpmHT</i>	<i>Esperminahidroxicinamoil-transferasa</i>
mM	Mil·limolar	<i>SpmS</i>	<i>Espermina-sintasa</i>
Molt 4	Línia cel·lular derivada de limfoma humà infantil	<i>STS</i>	<i>Estilbè-sintetasa</i>
<i>MPO</i>	<i>Mieloperoxidasa</i>	<i>t</i>	Triplet
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>	TC	Mostra control de fulles de tabac
MS	Espectrometria de masses	TD	Mostra de fulles de tabac senescents
MS/MS	Espectrometria de masses en tàndem	TE	Mostra de fulles de plantes de tabac sotmeses a estress hídric
Mw	Massa molecular	TLC	Cromatografia en capa fina
<i>m/z</i>	Relació massa/càrrega	TOF	Temps de volada
Na ₂ CO ₃	Carbonat sòdic	TPhC	Contingut total en compostos fenòlics
NaI	Iodur de sodi	t _R	Temps de retenció
<i>NCAH</i>	<i>N</i> -Carbamoilputrescina-amidohidrolasa	TU	Mostra de fulles de tabac joves
NADP ⁺	Fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina oxidat	u	Unitats (de massa)
NADPH	Fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina reduït	U	Unitats (d'enzim)
NBT ²⁺	Nitro-blue tetrazolium	URL	Unitats relatives de llum
NH ₄ OH	Hidròxid amònic	UV	Ultraviolat
NaH ₂ PO ₄	Fosfat monosòdic	V	Volts
Na ₂ HPO ₄	Fosfat disòdic	wt	<i>Wild type</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>	XO	Assaig de la <i>xantina-oxidasa</i>
NL	<i>Neutral loss scan</i>	α-TOH	α-Tocoferol
nm	Nanòmetres	δ	Valors de desplaçament químic
NMR	Ressonància magnètica nuclear	λ	Longitud d'ona
NO [·]	Radical òxid nítric	μg	Micrograms
<i>NOS</i>	<i>Òxid nítric-sintetasa</i>	μL	Microlitres
¹ O ₂	Oxigen singlet	μm	Micròmetres
O ₂	Oxigen molecular	μmol	Micromols
O ₂ ^{-·}	Anió-radical superòxid	%	Percentatge
O ₃	Ozó		
<i>ODC</i>	<i>Ornitina-descarboxilasa</i>		
[·] OH	Radical hidroxil		
ONOO ⁻	Peroxinitrit		
<i>PAL</i>	<i>Fenilalanina amoni-liasa</i>		
PIS	<i>Product ion scan</i>		
<i>POD</i>	<i>Polifenol-peroxidases</i>		
ppm	Parts per milió		
<i>PPO</i>	<i>Polifenol-oxidases</i>		
Prec	<i>Precursor ion scan</i>		

1.1.- Compostos fenòlics

1.1.1.- Concepte

Els compostos fenòlics constitueixen un grup molt nombrós de substàncies procedents del metabolisme secundari de les plantes, que presenten una gran diversitat estructural i funcional, ja que realitzen un ampli ventall de funcions biològiques. De fet, l'adaptació de les plantes a l'entorn terrestre va produir-se gràcies a la formació massiva de compostos fenòlics, de manera que, actualment, al voltant del 40% del carboni orgànic que hi ha a la biosfera està relacionat, directa o indirectament, amb aquest tipus de compostos. Aquesta elevada proporció es deu, en part, a la dificultat que presenten alguns fenols complexos a biodegradar-se (Croteau *et al.*, 2000).

Els fenols presents a les plantes tenen en comú la presència d'un o més grups hidroxil units a estructures aromàtiques més o menys complexes. Acostumen a ser solubles en aigua, ja que freqüentment es troben combinats amb sucres formant glicòsids, i es solen localitzar als vacúols cel·lulars (Harborne & Dey, 1989; Robards *et al.*, 1999). Una altra característica important és la seva acidesa, que en major o menor grau, ve donada per la tendència de l'enllaç entre l'oxigen i l'hidrogen a trencar-se formant el corresponent anió fenòxid, que augmenta la seva solubilitat en l'aigua (Waterman & Mole, 1994).

1.1.1.1.- Diversitat estructural

L'estructura dels compostos fenòlics varia des de molècules simples com ara els àcids benzoics, fins a compostos polimeritzats d'alt pes molecular com les lignines i els tanins condensats. A la *Taula 1.1* es mostra una classificació dels compostos fenòlics més significatius segons el seu esquelet carbonat, responsable de la diferenciació estructural entre els grups.

Tipus	Estructura base
Fenols simples	C ₆
Àcids benzoics	C ₆ -C ₁
Àcids hidroxicinàmics	C ₆ -C ₃
Cumarines	C ₆ -C ₃
Lignines	(C ₆ -C ₃) _n
Estilbens	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Tanins condensats	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Taula 1.1.- Classificació dels principals compostos fenòlics

Fenols simples

Estan formats per un anell aromàtic i un o més grups hidroxil com a substituents. Els fenols simples porten a terme diverses funcions fisiològiques, tant en el món vegetal (regulació de la germinació, resistència envers fitopatògens, o activació d'enzims) com en el món animal. Poden trobar-se antisèptics (com el fenol i el catecol), expectorants, diürètics, inhibidors de la mutagènesi i la citotoxicitat, etc. També existeixen compostos fenòlics de gran utilitat en fins diagnòstics i en el tractament de l'acne i la psoriasi. D'altra banda, cal destacar també les aplicacions de molts d'aquests compostos en la indústria. Així, el fenol i el *p*-cresol són utilitzats en la manufactura de resines i explosius, i l'hydroquinona i el catecol són reveladors fotogràfics. També es poden trobar aplicacions dels fenols simples com a mesclades antioxidants, herbicides i en l'elaboració de perfums i cosmètics (Harborne & Dey, 1989).

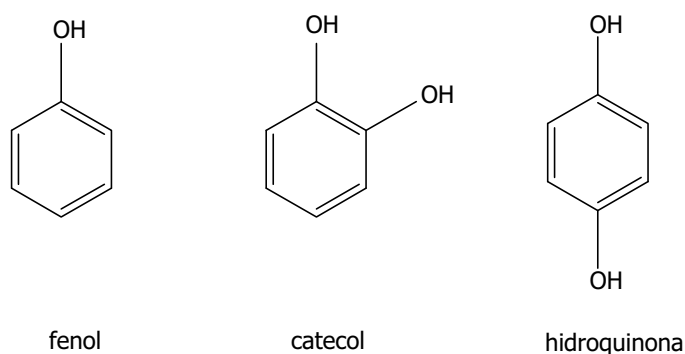


Figura 1.1.- Exemples dels fenols simples més rellevants

Àcids benzoics i hidroxicinàmics

Constitueixen un grup força abundant de compostos fenòlics. Dins dels àcids benzoics (C_6-C_1) hi ha compostos tan significatius com l'àcid gàl·lic (component fonamental dels tanins hidrolitzables) i l'àcid salicílic.

Els àcids hidroxicinàmics (derivats C_3-C_6) tenen una distribució molt àmplia i constitueixen l'origen biosintètic de tots els fenilpropanoides (veure *apartat 1.1.2* i *Figura 1.7*). En molts casos es troben associats a altres compostos, com és el cas de l'àcid clorogènic (producte de l'esterificació de l'àcid cafeic amb l'àcid quínic). Aquests compostos, incloent-hi els seus èsters, estan àmpliament distribuïts en les plantes medicinals i en els

aliments d'origen vegetal, i s'utilitzen com a diürètics (àcid cafeic i àcid rosmarínic), per tractar problemes digestius (àcid clorogènic) o com a antioxidants (àcid rosmarínic). També tenen activitat bactericida, fungicida i antitumoral (Escarpa & González, 2001).

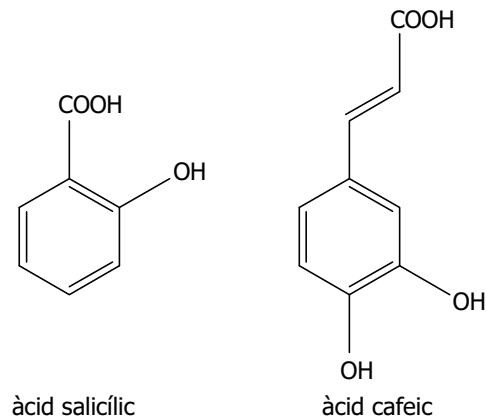


Figura 1.2.- Exemples d'àcids benzoics (salicílic) i hidroxicinàmics (cafeic)

Flavonoides i estibens

Els flavonoides constitueixen un grup de compostos fenòlics de gran rellevància, ja que tenen una alta prevalença en els aliments (fruites, verdures, te, etc), una especial importància i significació biològica, i una gran varietat d'estructures. De fet, es coneix l'estructura de més de 9000 flavonoides (Justesen *et al.*, 1998; Martens & Mithöfer, 2005; Erdman *et al.*, 2007).

L'estructura dels flavonoides està constituïda per un esquelet difenilpropà (sistema C₆-C₃-C₆), format per dos anells aromàtics (A i B) units per una unitat C₃, la qual sol estar ciclada formant un O-heterocicle (anell C) (Robards *et al.*, 1999).

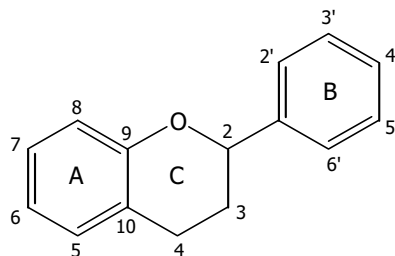


Figura 1.3.- Estructura base d'un flavonoide

Tant en els anells A i B, com en la fracció C₃, es poden trobar diversos grups hidroxil com a substituents. Segons el grau d'oxidació de la fracció C₃ (anell C), els flavonoides es classifiquen en diferents grups, els més significatius dels quals són els flavonols, les flavones, les isoflavones, les dihidroflavonols, les flavanones, els 3-hidroxiflavans, i les antocianidines (Ryan *et al.*, 1999).

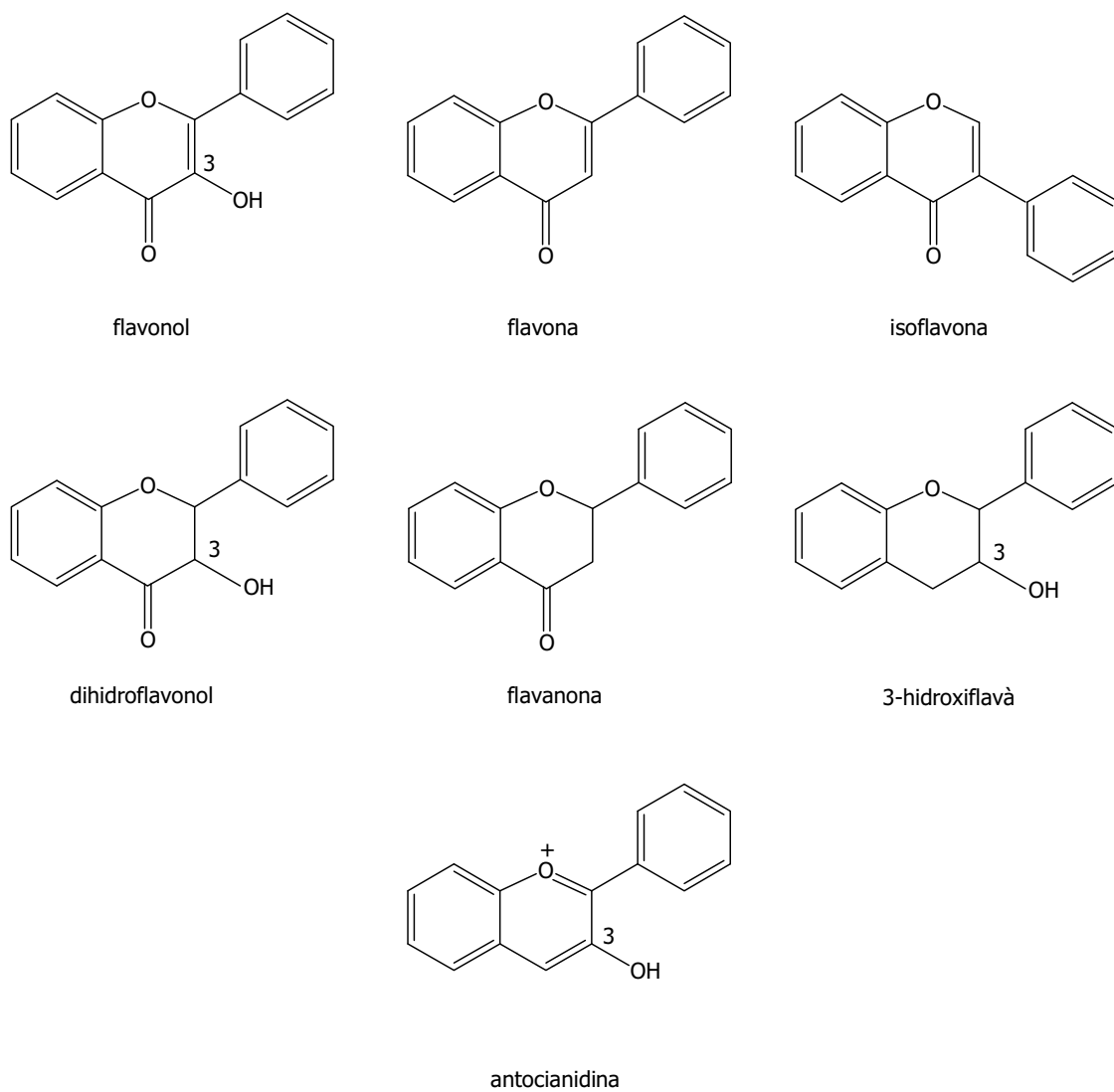


Figura 1.4.- Principals classes de flavonoides

Els flavonoides acostumen a ser solubles en aigua, ja que normalment es troben en forma de glicòsids. Aquesta glicosilació, a part d'augmentar la solubilitat en l'aigua, disminueix la reactivitat i toxicitat del compost, i facilita l'emmagatzematge en els vacúols, evitant efectes adversos en el citosol. Podem trobar *O*-glicòsids (en les posicions 3, 7 i 4') i *C*-glicòsids (posicions *C*-6 i *C*-8), tot i que aquests últims són poc freqüents. El sucre que apareix amb més freqüència és la glucosa, tot i que la galactosa, la ramnosa, la xilosa i l'arabinosa també són força comunes (Cuyckens & Claeys, 2004). Els flavonoides també poden unir-se a altres molècules com l'àcid glucurònic, o bé polimeritzar-se, donant lloc a formes dimèriques i oligomèriques. Els polímers més importants formen el grup dels tanins condensats. Cal diferenciar entre tanins condensats (polímers de flavonoides) i tanins hidrolitzables, que són derivats glucosilats de l'àcid gàl·lic o dels seus derivats (Cook & Samman, 1996; Nijveldt *et al.*, 2001; Ferreres *et al.*, 2004).

Els flavonoides són responsables de nombroses funcions biològiques. Són reconegudes les seves activitats antial·lèrgica, antiinflamatòria, antiviral, anticancerosa i antioxidant. Afecten a gran quantitat d'enzims i proteïnes associades a la fotofosforilació, i són capaços de neutralitzar radicals lliures i quelar cations metàl·lics. Entre les accions beneficioses dels flavonoides presents en la dieta, destaquen la prevenció del càncer, l'Alzheimer, l'aterosclerosi, les malalties cardiovasculars, etc (Harborne & Williams, 2000; Manthey, 2000).

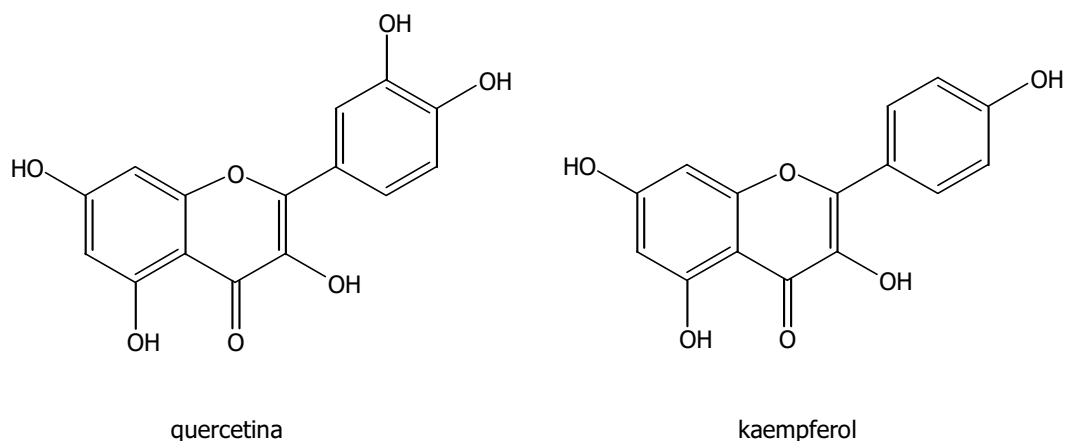
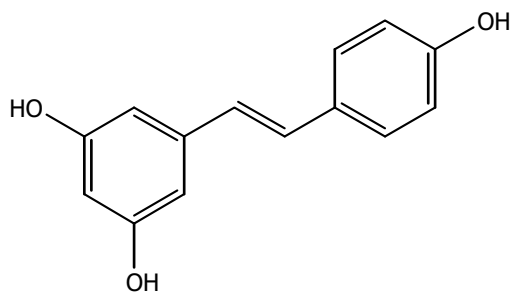


Figura 1.5.- Exemples de flavonoides de tipus flavonol

Els estilbens, estretament relacionats amb els flavonoides, són sintetitzats per un grup d'espècies vegetals no relacionades com la vinya (*Vitis vinifera*), el cacauet (*Arachis hypogaea*) i el pi (*Pinus sylvestris*). Degut a la seva estructura bàsica (sistema C₆-C₂-C₆), que no permet ciclacions addicionals, formen un grup reduït de productes. Dins els estilbens s'inclouen productes tan significatius com el resveratrol, que presenta activitat antitumoral, antiinflamatòria i antioxidant, entre altres (Jang *et al.*, 1997).



resveratrol

Figura 1.6.- Exemple d'estilbè

1.1.2.- Biosíntesi dels compostos fenòlics

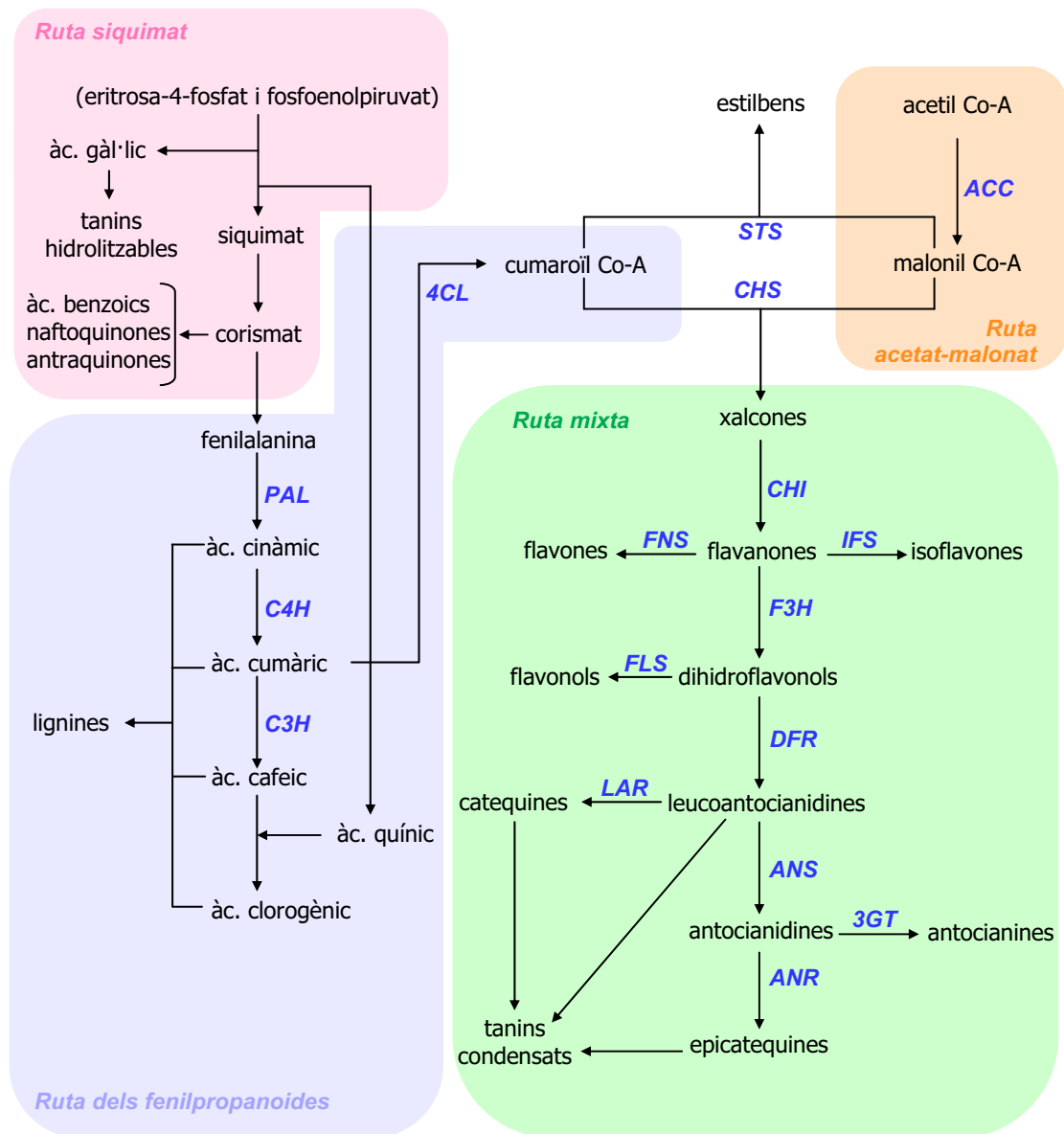


Figura 1.7.- Esquema de la ruta sintètica dels diferents tipus de compostos fenòlics. PAL, Fenilalanina amoniliasa; C4H, cinamat-4-hidroxilasa; C3H, cumarat-3-hidroxilasa; 4CL, 4-cumarat CoA-lligasa; ACC, acetil CoA-carboxilasa; STS, estilbè-sintetasa; CHS, xalcona-sintetasa; CHI, xalcona flavanona-isomerasa; FNS, flavona-sintetasa; IFS, isoflavona-sintetasa; F3H, flavanona-3-hidroxilasa; FLS, flavonol-sintetasa; DFR, dihidroflavonol-4-reductasa; LAR, leucoantocianidina-reductasa; ANS, antocianidina-sintetasa; ANR, antocianidina-reductasa; 3GT, antocianidina-3-glicosiltransferasa (Adaptació de Croteau *et al.*, 2000; Xie & Dixon, 2005)

1.1.2.1.- Ruta dels siquimat-fenilpropanoides

La via del siquimat uneix el metabolisme dels glúcids amb la biosíntesi de compostos aromàtics. De fet, proporciona els elements bàsics per a la síntesi dels aminoàcids fenilalanina, tirosina i triptòfan, així com de molts altres compostos aromàtics de gran importància pels organismes productors.

Aquesta via només es porta a terme en plantes i en microorganismes. En plantes superiors s'origina en els cloroplasts a partir de fosfoenolpiruvat i eritrosa-4-fosfat. Mitjançant 7 passos s'arriba a la formació de corismat, intermediari clau (punt de diversificació) important per a la biosíntesi de nombrosos compostos aromàtics (àcids benzoics, naftoquinones, antraquinones, aminoàcids aromàtics, fenilpropanoides, entre altres). A més dels productes que es formen a partir del corismat, els intermediaris precorísmics també serveixen de punt de partida per a la formació d'alguns compostos fenòlics importants, com ara l'àcid gàl·lic (precursor de tanins hidrolitzables) i l'àcid quínic (precursor d'èsters d'àcids cinàmics).

L'entrada a la ruta dels fenilpropanoides es produeix per acció de l'enzim *fenilalanina amoni-liasa* (*PAL*). Aquest enzim, mitjançant un procés de desaminació oxidativa, actua sobre la fenilalanina donant lloc a l'àcid cinàmic. La resta d'àcids hidroxicinàmics (cumàric, cafeic, ferúlic, sinàpic) es formen a partir de l'àcid cinàmic mitjançant *hidroxilases* (*cinamat-4-hidroxilasa*, *C4H*; *cumarat-3-hidroxilasa*, *C3H*) i *O-metiltransferases* (*cafeolat-3-O-metiltransferasa*, *COMT*). Els àcids cinàmics són el punt de partida de tots els fenilpropanoides, que inclouen productes tan diversos com èsters i amides d'àcids hidroxicinàmics (àcid clorogènic), cumarines, alcohols cinàmics, polímers (lignines i lignans), àcids benzoics (àcid salicílic) i derivats, hidroquinones, etc. Per poder sintetitzar els compostos esmentats, cal que els àcids cinàmics siguin activats (majoritàriament en forma de derivats-CoA), sent la *4-cumaroil-CoA-ligasa* (*4CL*) l'enzim més significatiu (Winkel, 2004).

En l'actual model de la biosíntesi de les lignines (*Figura 1.8*) pot observar-se com la conversió de cumaroil-CoA a cafeoil-CoA es dona principalment a través de l'actuació de l'enzim *C3H* a nivell d'èsters de l'àcid cumàric amb els àcids quínic o siquímic. Aquests èsters es sintetitzen en gran quantitat com a intermediaris en la formació de les lignines, ja que una part molt important del carboni que entra en la ruta dels fenilpropanoides va dirigit cap a la síntesi de lignines, que representen el segon polímer més abundant a la Terra, només superat per la cel·lulosa (Humphreys & Chapple, 2002; Hoffmann *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 2004).

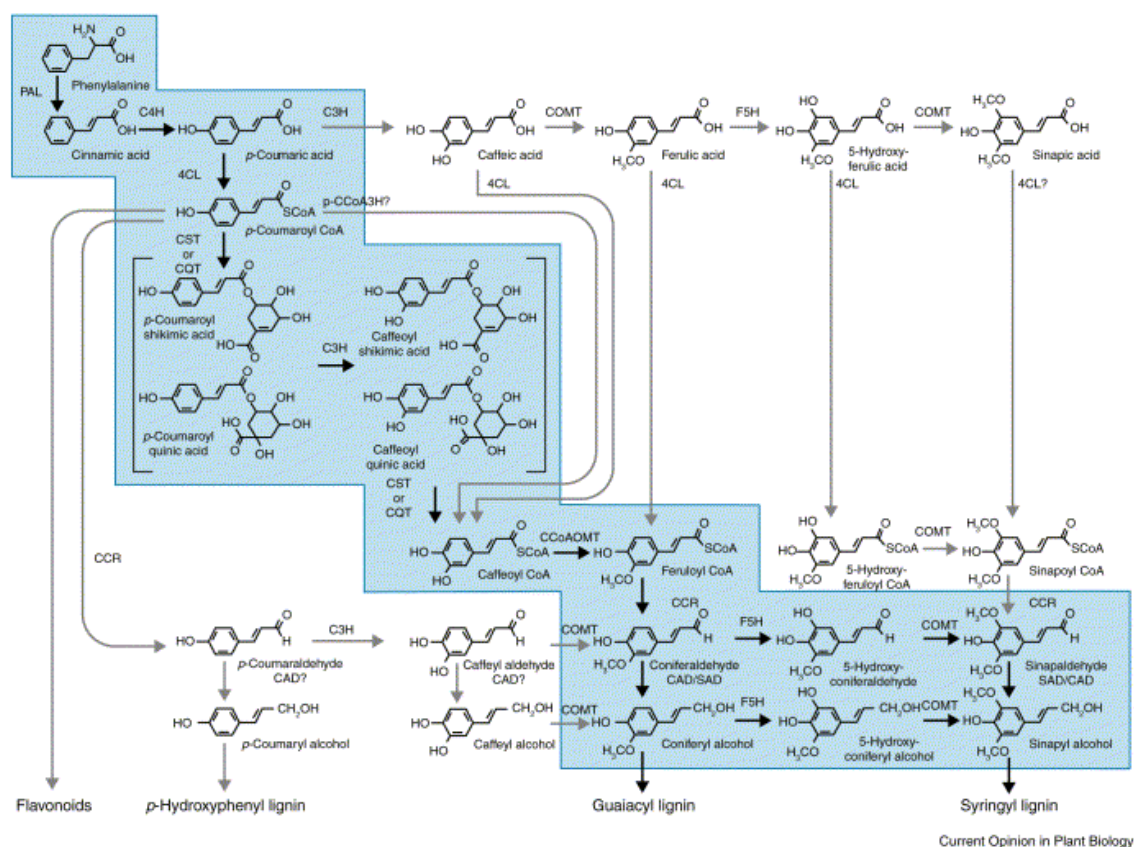


Figura 1.8.- Model revisat de la ruta dels fenilpropanoides enfocada cap a la síntesi de lignines. Les reaccions que es creuen que són claus en la biosíntesi de lignines estan indicades amb fletxes negres. Els compostos intermediaris i els enzims considerats en el camí prominent d'aquesta biosíntesi estan ressaltats en color blau. (Figura extreta de Humphreys & Chapple, 2002)

1.1.2.2.- Ruta de l'acetat-malonat

La ruta de l'acetat-malonat comença amb la formació de malonil-CoA, a partir de l'acetil-CoA mitjançant l'*acetil-CoA-carboxilasa* (*ACC*). Aquest compost és clau en la síntesi dels policètics. El grup dels policètics inclou un gran nombre de compostos fenòlics: dicètics, tricètics, tetracètics (àcids benzoics, alcaloides com la conitina, flavonoides i estilbens), pentacètics, hexacètics com les naftoquinones, octacètics com les antraquinones, nonacètics com les tetraciclins, o decacètics com les aflatoxines. La formació dels policètics implica la utilització d'enzims multifuncionals, que parteixen d'una molècula iniciadora (acetil-CoA, malonil-CoA, malonamoil-CoA, antranilil-CoA, cinamoil-CoA, *p*-cumaroil-CoA o 4-hidroxibenzoil-CoA), a la que uneixen diferents molècules de malonil-CoA (o bé derivats seus com el metilmalonil-CoA o l'etilmalonil-CoA). Els compostos intermediaris resultants són ciclats mitjançant mecanismes de condensació intramolecular (per formar estructures aromàtiques), de lactonització (per formar *O*-heterocicles) i de formació de bases de Schiff (per la síntesi de *N*-heterocicles) (Shen, 2000; Weissman, 2004).

1.1.2.3.- Ruta mixta

Aquesta ruta és la que dóna lloc a la formació de tots els flavonoides. Biosintèticament, els flavonoides són considerats tetracètids de síntesi mixta, ja que utilitzen el *p*-cumaroïl-CoA com a molècula iniciadora, a la qual s'uneixen tres molècules de malonil-CoA, amb una posterior condensació intramolecular de Claisen mitjançant l'enzim *xalcona-sintetasa* (*CHS*), donant lloc a la naringeninxalcona (2',4,4',6'-tetrahidroxixalcona), molècula d'estructura C₆-C₃-C₆, precursora de tots els flavonoides (Winkel-Shirley, 2001; Austin & Noel, 2003).

La conversió de xalcones en flavanones és catalitzada per la *xalcona flavanona-isomerasa* (*CHI*). La naringeninxalcona, de color groc, dona lloc a la flavanona naringenina, que és incolora. És habitual l'associació de la *CHS* i la *CHI* en un complex, que garanteix la direccionalitat i l'especificitat estereoquímica que requereixen els següents enzims del camí metabòlic. A partir de les flavanones poden formar-se les flavones, els 4-hidroxi flavans, les isoflavones i els dihidroflavonols.

Les flavones es formen per l'acció de la *flavona-sintetasa* (*FNS*), que crea un doble enllaç entre les posicions 2 i 3. La majoria de les flavones estan glicosilades, constituint un dels grups de flavonoides més nombrosos, presentant-se en quasi tots els teixits vegetals (Martens & Mithöfer, 2005).

Els 4-hidroxi flavans s'originen mitjançant la *dihidroflavonol-4-reductasa* (*DFR*), el mateix enzim que convertirà els dihidroflavonols en leucoantocianidines. Les isoflavones es formen gràcies a l'activitat del complex de la *isoflavona-sintetasa* (*IFS*), i a partir d'elles s'origina la resta d'isoflavonoides. Pràcticament només es troben isoflavonoides en la família de les Fabaceae, ja que la *IFS* és un enzim de distribució restringida (Ayabe & Akashi, 2006).

Els dihidroflavonols (3-hidroxi flavanones) es sintetitzen per acció de la *flavanona-3-hidroxilasa* (*F3H*), i a partir d'ells poden formar-se els flavonols (per acció de la *flavonol-sintetasa*, *FLS*) i les leucoantocianidines (per acció de la *DFR*). A partir de les leucoantocianidines poden formar-se antocianines (prèvia formació d'antocianidines) i tanins condensats (prèvia formació de catequines o epicatequines). Les antocianines es formen prèvia conversió de les leucocianidines en antocianidines per l'acció de l'*antocianidina-sintetasa* (*ANS*), les quals donen lloc a les antocianines mitjançant les *antocianidina-3-glicosiltransferases* (*3GT*) (Dixon *et al.*, 2005; Xie & Dixon, 2005). Els tanins condensats són estructuralment més complexes que els hidrolitzables, i tenen una distribució molt ampla, constituint el grup de polímers de flavonoides més significatiu. De fet, els tanins condensats

són productes de polimerització de 3-hidroxi flavans (catequines o epicatequines) i de 3,4-dihidroxi flavans (leucoantocianidines) que es presenten com a cadenes de 4 a 8 unitats. Les catequines (2,3-*trans*) s'originen a partir de les leucoantocianidines per acció de la *leucoantocianidina-reductasa* (*LAR*), mentre que les epicatequines (2,3-*cis*) es formen a partir de les antocianidines mitjançant l'*antocianidina-reductasa* (*ANR*) (Figura 1.9) (Bartel & Matsuda, 2003; Tanner *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2005; Xie & Dixon, 2005).

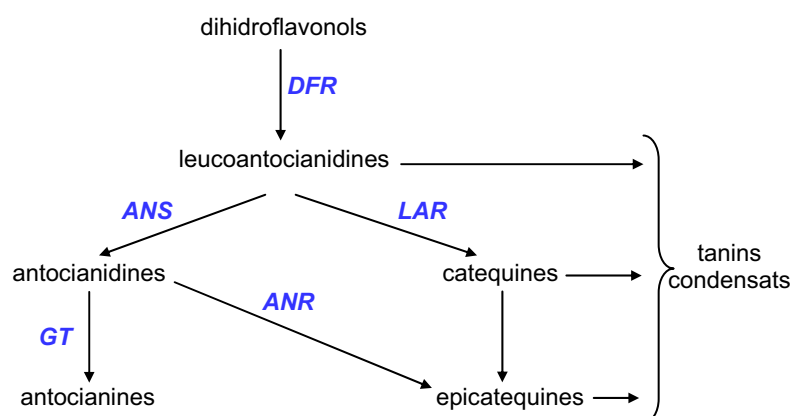


Figura 1.9.- Síntesi dels tanins condensats a partir de les leucoantocianidines, catequines i epicatequines (*DFR*, dihidroflavonol-4-reductasa; *ANS*, antocianidina-sintetasa; *3GT*, antocianidina-3-glicosil-transferasa; *LAR*, leucoantocianidina-reductasa; *ANR*, antocianidina-reductasa) (Adaptació de Xie & Dixon, 2005)

La majoria dels flavonoides estan glicosilats, dels quals els més abundants són els glicòsids de flavones, de flavonols i d'antocianidines. L'especificitat de substrat de les *glicosiltransferases* és força elevada i la glicosilació pot incloure, a més de monosacàrids, una gran varietat de disacàrids i trisacàrids, que solen acumular-se en els vacúols o en secrecions hidrofíliques.

Els estilbens es sintetitzen mitjançant l'acció de l'*estilbè-sintetasa* (*STS*), que actua de forma similar a la *CHS*, de manera que a una molècula de *p*-cumaroil-CoA se l'hi uneixen 3 molècules de malonil-CoA, però, en aquest cas, el procés de ciclació dóna lloc a una estructura bàsica de tipus C₆-C₂-C₆, a partir de la qual es formaran tots els estilbens.

1.1.3.- Els compostos fenòlics i la seva importància com a antioxidants

1.1.3.1.- Els radicals lliures i les espècies reactives d'oxigen

1.1.3.1.1.- Concepte de radical lliure

Un radical lliure és una molècula o fragment de molècula que conté un o més electrons desaparellats en l'orbital extern d'un dels seus àtoms. Aquests electrons desaparellats confereixen al radical una gran reactivitat química, ja que en ser inestables, tenen tendència a cedir o a captar un electró d'una altra molècula o radical per tal d'aconseguir una configuració electrònica estable (Halliwell, 1995). Aquesta alta reactivitat implica una baixa especificitat química, de manera que poden reaccionar amb tot tipus de molècules veïnes, ja siguin lípids, proteïnes, hidrats de carboni o DNA. A més, aquesta elevada reactivitat també fa que aquests radicals no sobrevisquin més d'uns quants microsegons en el medi, i en unes concentracions molt baixes. Tot i la presència d'electrons desaparellats en les capes més externes, aquests no determinen per si mateixos la càrrega global de la molècula resultant, així doncs podem trobar radicals que estiguin carregats positivament, negativament, o neutres. Una molècula neutra pot convertir-se en negativa guanyant un electró, o bé positiva perdent-lo, i de la mateixa manera, una molècula carregada positivament o negativament pot esdevenir neutra per l'addició o subtracció d'un electró (Cheeseman & Slater, 1993).

Els radicals lliures es generen tant a l'exterior del nostre organisme, com a l'interior, pels mecanismes següents:

- a) Trencament homolític d'un enllaç covalent. Aquest mecanisme és poc freqüent en sistemes biològics, ja que requereix una gran quantitat d'energia (llum, radiacions UV o ionitzants).
- b) Pèrdua d'un electró d'una molècula neutra
- c) Addició d'un electró a una molècula neutra

1.1.3.1.2.- Concepte d'espècie reactiva d'oxigen (ROS)

Els radicals lliures més importants en els sistemes biològics són aquells derivats de l'oxigen, però també hi ha algunes molècules que tenen oxigen i que no són radicals lliures, com el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), l'àcid hipoclorós (HOCl), l'oxigen molecular (O_2), i l'ozó (O_3), que participen de forma activa en les reaccions dels radicals lliures en els sistemes biològics. Per englobar totes aquestes substàncies derivades de l'oxigen, radicals i no radicals, s'ha creat el terme espècie reactiva d'oxigen (ROS). Així doncs, podem trobar ROS

que siguin radicals com el radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), molècules com el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), ions com el peroxinitrit (ONOO^-), i ions i radicals simultàniament com l'anió-radical superòxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$), tal com es mostra a la *Taula 1.2* (Yildirim *et al.*, 2000; Halliwell, 2006).

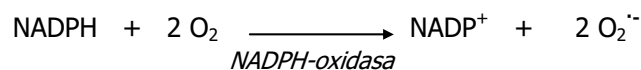
Espècies reactives d'oxigen (ROS)	
Radicals	No radicals
Superòxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	Peròxid d'hidrogen (H_2O_2)
Hidroxil ($\cdot\text{OH}$)	Oxigen (O_2)
Òxid nítric ($\text{NO}\cdot$)	Ozó (O_3)
Peroxil ($\text{ROO}\cdot$)	Peroxinitrit (ONOO^-)
Alcoxil ($\text{RO}\cdot$)	Hidroperòxid (ROOH)
	Àcid hipoclorós (HOCl)

Taula 1.2.- Classificació dels tipus de ROS segons si són radicals o no radicals

1.1.3.1.3.- Breu descripció de les ROS més significatives

Anió-radical superòxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Es forma en organismes aeròbics per la reducció de l'oxigen amb l'addició d'un electró, mitjançant enzims com la *NADPH-oxidasa* (en el procés de la fagocitosi), la *citocrom-oxidasa mitocondrial* (en la respiració cel·lular), el *citocrom P-450 hepàtic* (en el metabolisme oxidatiu dels xenobiòtics) o la *xantina-oxidasa* (en la fase de repercussió per isquèmia). La generació accidental d'aquest radical es deu, fonamentalment, a la fuga d'electrons de diferents sistemes (cadena de transport electrònic dels mitocondris i cloroplasts, *citocroms P-450* i enzims donadors d'electrons). També hi ha fonts externes de $\text{O}_2^{\cdot-}$, especialment el fum de les cigarretes (Asada, 1999).

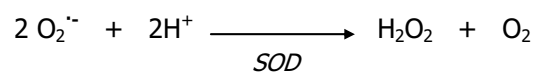


Aquest radical té una vida mitjana molt curta, per la qual cosa no s'allunya gaire del lloc on ha estat generat. En solució aquosa és poc reactiu, i es destrueix per dismutació donant lloc a H_2O_2 , de manera natural o mitjançant l'enzim *superòxid-dismutasa (SOD)*.

Els radicals $O_2^{\cdot-}$, per si mateixos, no són particularment perillosos, però algunes molècules diana poden reaccionar fàcilment amb ells, jugant un paper molt important en la formació d'altres intermediaris més reactius. En aquest sentit, la principal transcendència es deu al fet que són la font més important de H_2O_2 i que actuen com a reductors de metalls de transició, sent ambdós precursors del perillós radical $\cdot OH$. També pot reaccionar, entre d'altres, amb el radical òxid nítric (NO^{\cdot}) donant lloc al peroxinitrit ($ONOO^{\cdot}$) (Cheeseman & Slater, 1993).

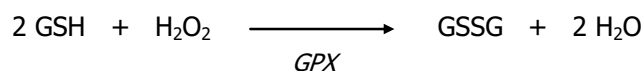
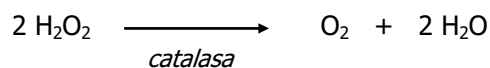
Peròxid d'hidrogen (H_2O_2)

El H_2O_2 pot originar-se a partir de la reducció de l'oxigen per dos electrons, però en sistemes biològics s'origina a partir de la dismutació espontània o enzimàtica (*SOD*) del radical $O_2^{\cdot-}$. De fet, la major part dels radicals $O_2^{\cdot-}$ formats *in vivo* són eliminats per la *SOD*, ja que aquest radical és més tòxic que el H_2O_2 i és important la seva ràpida eliminació. En els peroxisomes, el H_2O_2 també pot generar-se per l'acció de diverses *oxidases* (*glicolat-oxidasa*, *xantina-oxidasa*, etc).



Tot i que el H_2O_2 pot produir-se en un lloc i desplaçar-se a un altre, és un agent oxidant que a baixes concentracions no és particularment reactiu, però que a elevades concentracions pot atacar diversos sistemes de producció d'energia de les cèl·lules. És capaç d'oxidar els grups tiol de les proteïnes, i també està implicat en la producció de HOCl en els neutròfils. De totes maneres el seu efecte més nociu es deu a la producció de radicals $\cdot OH$ en presència de metalls de transició i del radical $O_2^{\cdot-}$.

Fisiològicament, el H_2O_2 s'elimina per l'acció de la *catalasa* i la *glutatió-peroxidasa* (*GPX*) tal com s'indica a continuació:

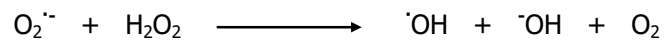


Radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$)

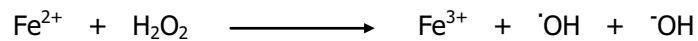
Es tracta de la ROS més reactiva en els sistemes biològics, ja que és capaç d'interaccionar amb quasi totes les biomolècules del seu entorn en el mateix lloc on és generat i no existeixen mecanismes fisiològics de defensa que el puguin eliminar. A més, indueix la peroxidació lipídica (Cheeseman & Slater, 1993).

El $\cdot\text{OH}$ pot originar-se a partir del H_2O_2 mitjançant les reaccions de Haber-Weiss i de Fenton, però també pot formar-se *in vivo* per fissió homolítica dels enllaços de l'aigua per l'acció de radiacions ionitzants.

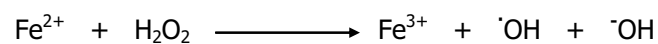
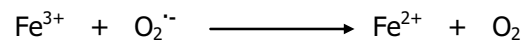
La Reacció de Haber-Weiss utilitza el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ com a donador d'electrons:



En la Reacció de Fenton es substitueix el $\text{O}_2^{\cdot-}$ per l'ió ferrós (Fe^{2+}), que actua com a agent reductor:



També poden donar-se les dues reaccions de manera simultània, mitjançant l'anomenada Reacció de Haber-Weiss catalitzada per Fe:

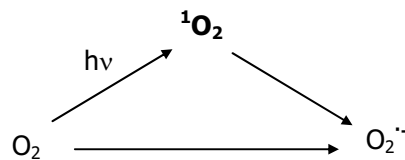


En condicions normals, però, el *pool* de Fe^{2+} lliure disponible en l'organisme per catalitzar la reacció és limitat, ja que es disposa de diversos transportadors de Fe per prevenir l'alliberament imprevisible, i així limitar la seva disponibilitat per catalitzar la reacció. L'evidència, encara no confirmada, que un excés de Fe està relacionat amb un increment del

risc de malalties cardiovasculars i càncer, podria explicar-se pel paper que juga el Fe en la formació dels d'aquests radicals $\cdot\text{OH}$ (Weiss & Gordeuk, 2005).

Oxigen singlet ($^1\text{O}_2$)

El $^1\text{O}_2$ és una forma electrònicament excitada de l'oxigen, amb una vida mitjana molt curta, entre 10^{-6} i 10^{-5} segons. Per la formació d'aquesta ROS és necessària l'aportació d'energia, que sol provenir de la llum solar. L'absorció d'aquesta energia fa desplaçar un dels electrons a un orbital d'energia superior. Presenta una activitat oxidant molt forta, sent capaç de combinar-se amb molècules que no reaccionen amb l'oxigen en el seu estat bàsic. Els seus objectius preferencials són els dobles enllaços dels àcids grassos poliinsaturats (PUFA) o de les bases nitrogenades. Aquest radical juga un paper molt important en l'aparició del càncer de pell, ja que aquest teixit està molt exposat a la llum.



En els sistemes biològics, el $^1\text{O}_2$ es pot formar mitjançant reaccions de fotosensibilització quan determinats fàrmacs, cosmètics, toxines de plantes i pigments són il·luminats en presència d'oxigen. També pot generar-se de forma enzimàtica per acció de *peroxidases* o *lipooxygenases*, per la reacció del H_2O_2 amb el HOCl o el ONOO $^-$, o bé durant l'explosió respiratòria (*respiratory burst*) del fagòcits (Steinbeck *et al.*, 1992; Di Mascio *et al.*, 1996).

El $^1\text{O}_2$ pot ser eliminat per l'àcid ascòrbic (vitamina C) (en fase aquosa), i pel α -tocoferol (vitamina E) i els carotenoides (en fase lipídica).

Òxid nítric ($\text{NO}\cdot$)

Es tracta d'un radical lliure gasós, que es forma a partir de la L-arginina per l'acció de l'enzim *òxid nítric-sintetasa* (*NOS*), principalment a les cèl·lules de l'endoteli vascular, als neutròfils i als macròfags.

Aquesta ROS té una gran importància biològica degut al seu paper com a molècula de senyalització, regulant un ampli espectre d'accions al sistema nerviós, cardiovascular i

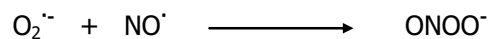
immunològic com per exemple la inhibició plaquetària, la regulació de la pressió arterial, la mort cel·lular programada o la resposta a infeccions (Wink & Mitchell, 1998; Mount & Power, 2006).

En les cèl·lules de l'endoteli vascular poden formar-se petites quantitats de $O_2^{\cdot-}$, que poden reaccionar amb el NO^{\cdot} formant $ONOO^-$. Com que el NO^{\cdot} és un agent vasodilatador, la capacitat del $O_2^{\cdot-}$ per eliminar aquests radicals pot produir efectes vasoconstrictors. Per això s'ha suggerit el paper del $O_2^{\cdot-}$ en la patogènesi de la hipertensió (Wink & Mitchell, 1998).

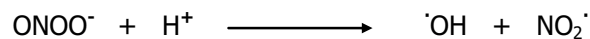
El radical NO^{\cdot} també intervé en la inducció de la lipoperoxidació, de manera directa, o bé en combinació amb el $O_2^{\cdot-}$ (Rajaraman *et al.*, 1998).

Peroxinitrit ($ONOO^-$)

El $ONOO^-$ es produeix per la reacció del NO^{\cdot} amb el radical $O_2^{\cdot-}$. Com a resultat d'aquesta reacció entre dos radicals es forma un no radical.

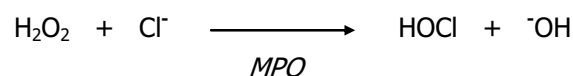


El $ONOO^-$ pot oxidar els grups sulfhidril de les proteïnes o induir la peroxidació de lípids. De fet, pot exercir la seva toxicitat directament o bé descompondre-se en altres productes tòxics i inestables.



Àcid hipoclorós (HOCl)

El HOCl és un potent oxidant que es sintetitza com a principal agent bactericida en els neutròfils. Es forma per l'acció de la *mieloperoxidasa* (*MPO*) sobre els ions clorur en presència de H_2O_2 . Aquesta reacció es porta a terme en els fagosomes dels neutròfils després de la seva fusió amb els lisosomes que contenen *MPO*.



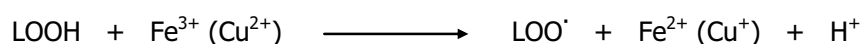
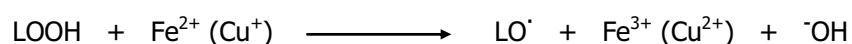
El HOCl és capaç de travessar les membranes cel·lulars i, en presència d'ions de metalls de transició, pot generar $\cdot OH$ (Aruoma, 1994).

S'ha observat que el HOCl pot iniciar la peroxidació dels lípids i que, combinant-se amb H₂O₂, pot lesionar el DNA i els seus mecanismes de reparació, alterant, al mateix temps, la concentració de Ca²⁺ intracel·lular i el pH. D'altra banda, el HOCl reacciona amb els grups sulfhidril i amino de les proteïnes, i pot clorar les bases puríniques del DNA, contribuint a les lesions dels teixits durant els processos inflamatoris. Degut a aquestes propietats, el HOCl s'utilitza en molts blanquejadors basats en clor i en desinfectants utilitzats en àrees de manipulació d'aliments (Panasenکو, 1997).

L'àcid ascòrbic i l'albumina són potents desactivadors del HOCl a concentracions fisiològiques.

Radicals peroxil (LOO·) i alcoxil (LO·)

Els radicals LOO· i LO· es formen com a intermediaris en el procés de la peroxidació lipídica (veure *apartat 1.1.3.2.2*), que s'inicia amb la subtracció d'un àtom d'hidrogen d'un PUFA. Els hidroperòxids de lípids (LOOH) es formen per acció de les *lipooxigenases*, en presència de metalls de transició (Brash, 1999). Els LOO· i LO· generats poden propagar la peroxidació en reaccionar amb els àcids grassos adjacents. Cal tenir en compte que els metalls de transició (especialment el Cu i el Fe) són potents promotors de radicals lliures, i que les *lipooxigenases* poden generar peròxids en els aliments i en les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), facilitant el desenvolupament de l'arterosclerosi. D'altra banda, els aldehids (productes generats en darrer terme en el procés de peroxidació de lípids), en reaccionar amb grups amínics de pèptids i proteïnes, poden estar implicats en el mecanisme de modificació de lipoproteïnes.



La peroxidació lipídica de la membrana produeix alteracions de les funcions secretores i dels gradients iònics. A més, molts residus químics d'aquestes reaccions poden difondre i provocar edemes, alterar la permeabilitat vascular, desencadenar reaccions inflamatòries i quimiotaxi, estimular la *fosfolipasa A2* i induir l'alliberació de l'àcid araquidònic, amb la consegüent formació d'eicosanoides. Tanmateix, s'ha trobat una estreta relació entre l'elevació de les concentracions d'alguns productes terminals de la peroxidació lipídica, l'activació de proto-oncogens i la promoció de tumors (Biasi *et al.*, 2007).

Entre els neutralitzadors més importants d'aquests radicals es troben el glutatió (GSH) i la vitamina C en fase aquosa, i la vitamina E i els β -carotens en fase lipídica.

1.1.3.2.- Estrès oxidatiu

1.1.3.2.1.- Definició d'estrès oxidatiu

La formació de ROS és un procés natural, constant i inevitable associat a la vida en condicions aeròbiques. Totes les cèl·lules produeixen ROS contínuament, a més, també n'arriben procedents de l'exterior de l'organisme. La formació d'aquestes ROS és necessària i beneficiosa per la supervivència dels éssers vius (*Figura 1.10*), però si aquestes espècies reactives estan en excés, seran perjudicials. Aleshores cal l'existència d'unes defenses antioxidants endògenes que les neutralitzin, de manera que es mantingui un equilibri entre la quantitat de ROS i les defenses antioxidants (Bulguer & Helton, 1998).

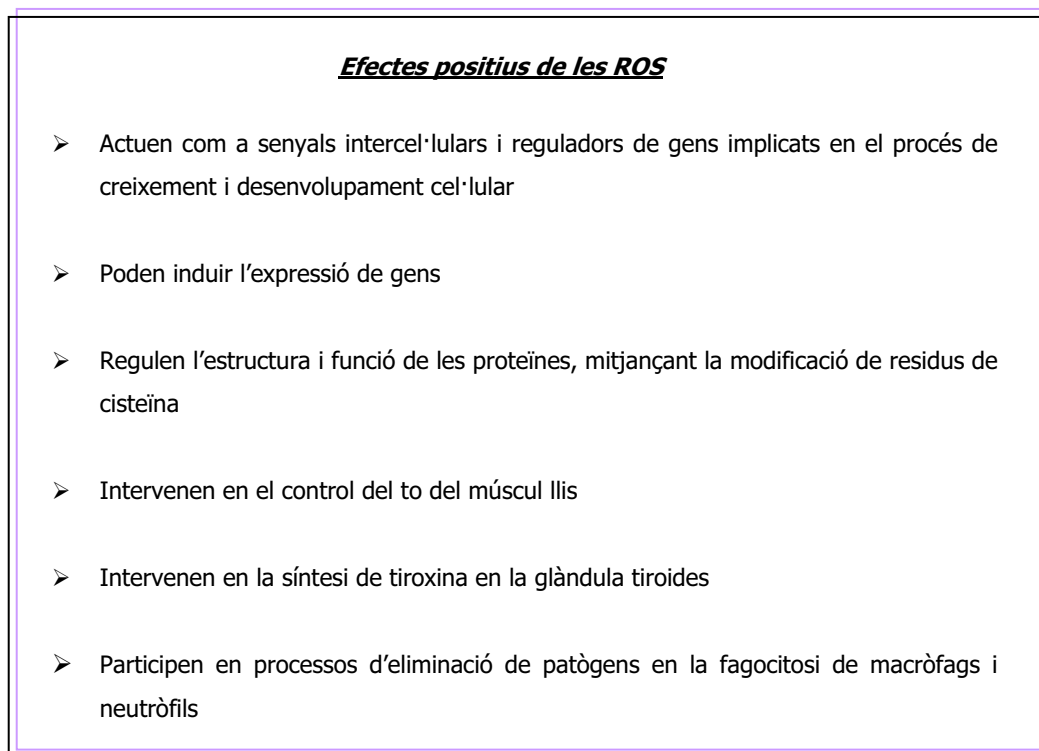


Figura 1.10.- Funcions fisiològiques i efectes beneficiosos de les ROS

L'equilibri que s'estableix entre els sistemes oxidants i antioxidants, constitueix un element essencial en el desenvolupament i la fisiologia normal dels organismes vius, així com en la regulació general del metabolisme.

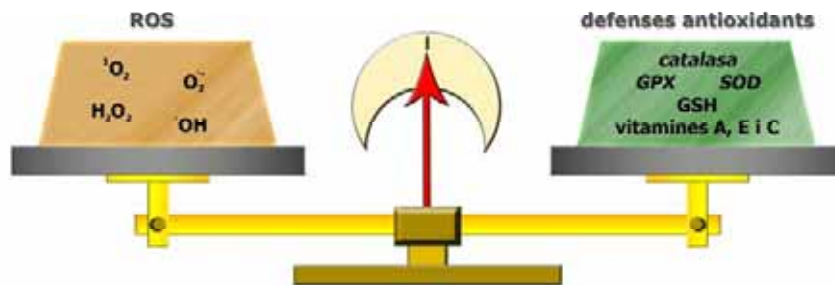


Figura 1.11.- Representació de l'equilibri entre les ROS i les defenses antioxidants

L'estrès oxidatiu es pot definir com l'estat en el qual el nivell de ROS sobrepassa les defenses antioxidants de l'organisme, com a resultat d'un desequilibri entre els sistemes de formació i eliminació de ROS (Finkel & Holbrook, 2000; Mittler, 2002).

Existeixen una sèrie de factors externs que poden fer desequilibrar aquesta balança i desencadenar una situació d'estrès oxidatiu. Aquests factors poden ser químics (com ara metalls pesats, herbicides, pesticides, xenobiòtics i fàrmacs), físics (com poden ser les radiacions ionitzants i UV, o bé l'hiperòxia), i orgànics o metabòlics (dieta hipercalòrica o amb un baix contingut en antioxidants, diabetis mellitus, exercici extenuant, processos inflamatoris, traumatismes, isquèmia-reperfusió, etc).

1.1.3.2.2.- Efectes perniciosos de l'estrès oxidatiu

Un estrès oxidatiu està associat a un excés de ROS, que poden reaccionar amb diferents tipus de components cel·lulars com lípids, proteïnes i àcids nucleics, produint traumatismes locals i una eventual disfunció dels òrgans.

Entre els mecanismes pels quals els radicals lliures malmeten les cèl·lules hi ha la peroxidació lipídica, el *cross-linking* (que consisteix en reaccions de fusió entre proteïnes o molècules de DNA), la destrucció de la membrana cel·lular (que fa que s'alteri el pas de

substàncies a través d'ella), la destrucció de lisosomes, i l'acumulació de pigments com la lipofuscina, que interfereix en la química cel·lular.

Peroxidació lipídica

Els lípids són probablement les biomolècules més susceptibles a l'atac dels radicals lliures. Les ROS, en particular el radical $\cdot\text{OH}$, tenen com a objectiu preferent els PUFA que formen part de la fase lipídica de les membranes cel·lulars. La peroxidació lipídica es desenvolupa mitjançant una sèrie de reaccions en cadena, que un cop engegada, es propaga ràpidament donant lloc a lesions que disminueixen la fluïdesa de les membranes.

El procés (*Figura 1.12*) s'inicia amb la pèrdua d'un electró d'un doble enllaç d'un PUFA (LH), donant lloc al radical L \cdot (Brash, 1999). El radical lliure format pot tenir diferents destinacions. Una de les més freqüents és la reacció amb una molècula d'oxigen, formant el radical LOO \cdot . En la fase de propagació, aquest radical LOO \cdot pot captar un electró d'un altre PUFA (L'H) proper, donant lloc a un hidroperòxid lipídic (LOOH) i a un nou radical (L' \cdot), que a la vegada pot reaccionar amb oxigen formant un altre peroxiradical, i així successivament. D'altra banda, el radical LOO \cdot pot interaccionar amb un altre LOO \cdot , unint les cadenes laterals entre sí mitjançant un enllaç covalent. També pot formar un enllaç covalent reaccionant amb un radical (L \cdot). En ambdós casos, la formació de radicals arriba a la fi. Tanmateix, els LOOH poden descompondre's en diferents radicals i/o donar lloc, finalment, a aldehids, diens conjugats i altres productes. Com a conseqüència d'aquest conjunt de reaccions (fase de terminació), es produeix una desorganització de les membranes (resultat de la deformació de les cadenes laterals dels àcids grassos), amb canvis letals per a la cèl·lula, que es poden estendre a teixits, i fins i tot a òrgans sencers. La lipoperoxidació s'associa a l'etiologia de diferents patologies o situacions fisiològiques, com l'aterosclerosi, l'artritis reumatoide, l'emfisema pulmonar, el càncer, i el procés d'envelliment cel·lular. De totes maneres, la idea que la peroxidació lipídica té només un efecte destructiu ha canviat. Actualment es sap que molts hidroperòxids lipídics participen en la transducció de senyals i en la formació de compostos com ara prostaglandines i jasmonats (Blokhina *et al.*, 2003).

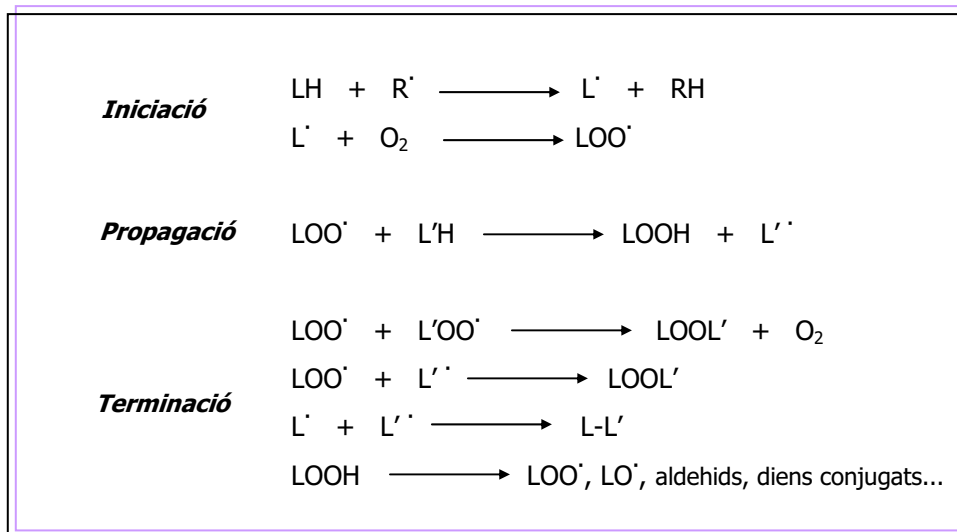


Figura 1.12.- Reaccions en cadena de la peroxidació lipídica

Lesions a proteïnes

Les proteïnes també poden ser atacades per les ROS, produint-se canvis estructurals i funcionals. Ara bé, les proteïnes no són tan susceptibles als atacs dels radicals lliures com els PUFA, i hi ha menys possibilitats per a la progressió de les reaccions en cadena. De fet, l'atac dels radicals lliures a les proteïnes només es dona quan es produeix una acumulació de radicals, o quan l'atac, facilitat per la unió de la proteïna a un ió d'un metall de transició, convergeix en un lloc concret de la proteïna. Tanmateix, els aldehids procedents de la peroxidació lipídica poden reaccionar amb grups sulfhidril o amb aminoàcids bàsics (histidina, lisina). Cal tenir en compte que, tot i que totes les cadenes laterals dels aminoàcids que conformen les proteïnes són susceptibles de ser atacades, les més vulnerables són les cadenes laterals de la tirosina, la fenilalanina, el triptòfan, l'histidina, la metionina, la lisina i la cisteïna. Les estructures més afectades solen ser les proteïnes de membrana (canals iònics i receptors) i les proteïnes estructurals responsables del procés de contracció muscular.

Lesions al DNA

Les lesions al DNA, tal com passa a les proteïnes, no són tan freqüents, i només es donen quan els radicals lliures es formen al seu costat (per exemple com a conseqüència d'una irradiació). En aquest cas, els efectes més freqüents dels atacs dels radicals lliures són les modificacions de les bases, el trencament de les fibres i la formació d'enllaços creuats. (Cadet *et al.*, 1997). Les lesions oxidatives al DNA, en condicions metabòliques normals, són

força elevades, i moltes d'elles donen lloc a mutacions. Tot i així, existeix un grup d'enzims, anomenats reparadors, que reparen aquestes lesions, encara que no són eficaços al cent per cent. Per tant, les lesions oxidatives i les mutacions van acumulant-se amb l'edat i poden contribuir al desenvolupament de malalties com el càncer i processos inflamatoris crònics (Wiseman & Halliwell, 1996).

1.1.3.2.3.- Malalties i disfuncions orgàniques relacionades amb l'estrès oxidatiu

Durant els últims anys s'ha posat de manifest l'existència d'una estreta relació entre aquesta situació de desequilibri i una sèrie de processos fisiopatològics que limiten la qualitat i l'expectativa de vida de moltes persones. Entre aquests processos destaquen l'aterosclerosi, la carcinogènesi, les inflamacions, les malalties neurodegeneratives (Alzheimer, Parkinson), les cataractes, la diabetis, la malària, les malalties autoimmunitàries, etc. A més, els processos patogènics propis de l'envelliment s'acceleren en relació directa amb la magnitud de l'estrès oxidatiu (Fridovich, 1998; Yildirim *et al.*, 2000; Waris & Ahsan, 2006).

El fenomen de l'envelliment ha centrat un debat intens en els darrers anys, però entre les diferents teories que han sorgit al respecte, la que situa l'estrès oxidatiu com a punt clau del procés, i els antioxidants com a mecanismes per aturar-lo, és la que ha anat agafant més força. Així, mentre que en un principi es va afirmar que els organismes que més anys vivien eren aquells amb una taxa metabòlica inferior, ara s'ha demostrat que són aquells amb més i més bones defenses antioxidants els que més anys viuen, tot i tenir una taxa metabòlica elevada (Finkel & Holbrook, 2000).

1.1.3.3.- Mecanismes de defensa davant l'estrès oxidatiu

1.1.3.3.1.- Els antioxidants

Els antioxidants són substàncies capaces de prevenir, aturar o retardar determinades reaccions d'oxidació, protegint les molècules biològiques de les agressions oxidatives. Degut al seu caràcter altament reductor, reaccionen amb les substàncies oxidants abans que les molècules biològiques, impedit així que aquestes resultin danyades.

Per contrarestar la quantitat de ROS que es formen en l'organisme de manera natural i les que hi arriben de l'exterior, el propi organisme disposa d'una sèrie de substàncies i mecanismes antioxidants, l'anomenat sistema antioxidant (Finkel & Holbrook, 2000). Aquests mecanismes es basen principalment en la capacitat de reduir ROS i quelar metalls, evitant així les reaccions catalitzades pels radicals lliures com la peroxidació lipídica.

Tot i així, l'activitat antioxidant també pot donar-se de manera indirecta, ja que molts antioxidants són cofactors o bé moduladors de l'expressió de gens que codifiquen per enzims amb activitat antioxidant, com la *peròxid-dismutasa* o la *GPX* (Soobrattee *et al.*, 2005).

Gràcies a aquesta capacitat protectora davant l'oxidació i l'acció de les ROS, els antioxidants són de gran ajuda pel tractament i la prevenció de diferents malalties. Entre les accions beneficioses, destaquen la reducció de l'oxidació de les LDL, la disminució de l'agregació plaquetària, el bloqueig dels efectes de la promoció d'oxidacions induïdes per diverses hormones secretades en situacions d'estrès com l'adrenalina i la noradrenalina, la reducció dels efectes oxidants dels radicals lliures, la inhibició de processos aberrants del metabolisme, la participació en la resposta immunitària davant les infeccions virals i diferents tipus de càncer, la disminució dels efectes perjudicials del sistema immunitari en la resposta inflamatòria (com els que es donen en l'artritis reumatoide o l'Alzheimer), o la protecció contra processos degeneratius del cervell i el control del procés de l'envelliment. De totes maneres, els antioxidants són agents preventius a llarg termini. No poden invertir el procés, però poden retardar-lo. Els efectes que condueixen a malalties cròniques són acumulatius, normalment després de dècades. Per això, és important que els antioxidants siguin administrats diàriament i al llarg de la vida.

La quantitat d'antioxidants propis de l'organisme no és il·limitada, i per tant, cal renovar constantment les seves fonts, ja sigui de forma endògena o bé amb suplementes procedents de l'exterior. De fet, el nostre cos produeix antioxidants de manera endògena, com ara els enzims *GPX* i *catalasa*, l'àcid α -lipoic, o el coenzim Q-10, però també n'hi arriben molts a partir de la dieta, sobretot de les fruites i verdures. A més, també hi ha suplementes dietètics, molt utilitzats en països com els Estats Units, on la dieta habitual és deficient en antioxidants. Cal tenir en compte que l'estil de vida pot influir en gran mesura en la generació d'una situació d'estrès oxidatiu. Com a hàbits negatius es poden destacar el sedentarisme, una dieta inadequada, i tòxics com el tabac, les drogues o l'alcohol. D'altra banda, una alimentació rica en fruites i verdures ha demostrat que pot disminuir el risc de patir malalties cròniques associades a l'estrès oxidatiu, ja que tenen un alt contingut de compostos antioxidants (Ramarathnam *et al.*, 1995).

1.1.3.3.2.- Tipus i fonts naturals d'antioxidants (el sistema antioxidant)

Existeix un ampli ventall de sistemes i compostos antioxidants. Aquests es poden classificar segons diferents criteris, com per exemple segons el mecanisme d'acció (enzimàtics, no enzimàtics), el punt d'actuació en la cadena oxidativa (preventius,

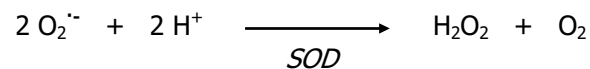
reparadors), o segons la seva procedència (endògens, exògens). Tots aquests antioxidants tan diversos no actuen per separat, sinó que es complementen entre ells, regenerant-se els uns als altres i intervenint en diferents punts, de manera que conformen un equilibri de peces destinat a evitar un excés de substàncies oxidants a l'organisme, i els seus efectes perjudicials. A continuació s'exposa una breu descripció de cada tipus d'antioxidant segons la seva procedència:

Fonts endògenes

Una part important del sistema de defensa antioxidant a l'interior de les cèl·lules està constituïda pels enzims antioxidants. L'elevada presència d'aquests enzims en sistemes biològics, dóna testimoni de la importància que tenen per a la supervivència de l'organisme.

Superòxid-dismutasa (SOD)

La *SOD* converteix dos radicals $O_2^{\cdot -}$ en una molècula de H_2O_2 i una d'oxigen. Aquest enzim es troba en totes les cèl·lules i pot presentar-se en tres formes diferents: la *Mn-SOD*, que es troba en els mitocondris; la *CuZn-SOD*, que es troba en el citosol i altres orgànuls cel·lulars; i la *Cu-SOD* que es troba en l'espai extracel·lular, secretada per determinades cèl·lules com fibroblasts i cèl·lules endotelials. La forma predominant és la *CuZn-SOD*.

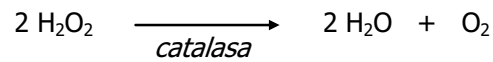


Aquest enzim és fonamental com a primera línia de defensa. Tot i així, el mateix increment de H_2O_2 inactiva lentament la *CuZn-SOD*, però d'altres enzims com les *catalases* i les *peroxidases* seran responsables de la reducció d'aquest H_2O_2 (Fridovich, 1995).

Recentment s'ha descobert que el gen de la *SOD* és defectuós en pacients amb esclerosi lateral amiotròfica. A més, les investigacions sobre la patogènesi del Síndrome de Down han mostrat una sobreproducció de *SOD*, revelant la possibilitat d'una relació amb l'increment de l'activitat dels radicals lliures (Zana *et al.*, 2007).

Catalases

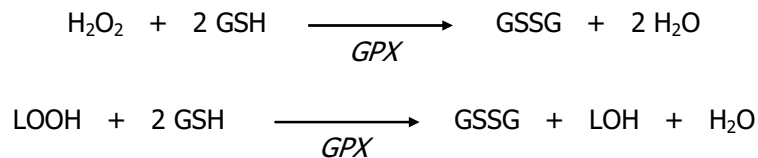
Les *catalases*, juntament amb les *peroxidases* són els enzims responsables de l'eliminació del H₂O₂, convertint-lo en aigua i oxigen. Les *catalases* tenen una afinitat pel substrat més baixa que les *peroxidases*, ja que la reacció necessita l'accés simultani de dues molècules de H₂O₂ al centre actiu de l'enzim (Willekens *et al.*, 1997).



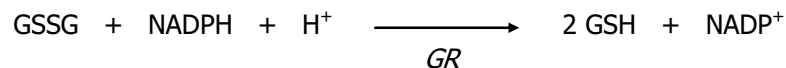
Les *catalases* tenen 4 subunitats proteiques, amb un grup prostètic de tipus hemo cadascuna. Es localitzen en els peroxisomes de la majoria de cèl·lules aeròbiques i, en els animals, es concentren fonamentalment al fetge i als eritròcits.

Glutatió-peroxidasa (GPX) i glutatió-reductasa (GR)

La *GPX* és una proteïna tetràmera amb 4 àtoms de Se units en forma de selenocisteïna. Aquest enzim catalitza la reducció del H₂O₂ (i de tots els LOOH en general), oxidant el GSH. Es distribueix per tots els teixits, i dins la cèl·lula es localitza en el citosol i a l'interior dels mitocondris.



La regeneració del GSH a partir de la seva forma oxidada (GSSG), és catalitzada per la *GR*, que utilitza NADPH com a font de poder reductor.



En animals, el GSH és l'agent reductor més utilitzat per les *peroxidases* com la *GPX*, i l'activitat d'aquests enzims depèn, en part, de la relació GSSG/GSH. La concentració relativa d'aquests compostos és un reflex de l'estat redox de la cèl·lula i un factor important en els processos de neutralització de LOOH (Halliwell, 1995).

Ascorbat-peroxidasa (APX), "Cicle de l'ascorbat - glutatió"

En les cèl·lules vegetals, el substrat reductor més important per a l'eliminació del H_2O_2 és l'ascorbat. La *APX* utilitza dues molècules d'ascorbat per a reduir el H_2O_2 a aigua, amb la concomitant generació de dues molècules de monodehidroascorbat (MDHA), radical que, si no és reduït ràpidament, pateix una desprotonació convertint-se en ascorbat i dehidroascorbat (DHA). El MDHA pot ser reduït directament a ascorbat mitjançant la *MDHA-reductasa (MDHAR)*, però malgrat la possibilitat d'aquesta regeneració directa, la ràpida desprotonació del radical MDHA implica que sempre es produeixi una quantitat important de DHA. Aleshores, aquest DHA és reduït a ascorbat mitjançant la *DHA-reductasa (DHAR)*, que utilitza GSH com agent reductor. El GSSG format com a conseqüència, és reciclat de nou a GSH mitjançant la *GR*. Aquest conjunt de reaccions que tanquen el cicle es coneix com a "Cicle de l'ascorbat-glutatió" (Noctor & Foyer, 1998; Blokhina *et al.*, 2003).



Figura 1.13.- Cicle de l'ascorbat-glutatió

Altres antioxidants endògens

Hi ha tot un conjunt d'enzims (*fosfolipasa A2 i C, endo i exonucleases, ADN-glicosilases, peroxidases i metioninasulfòxid-reductasa*) que tenen la responsabilitat de la reparació directa dels danys produïts a proteïnes, DNA, RNA, lípids i glúcids. També degraden les molècules oxidades, conservant les estructures bàsiques no danyades, i eliminen els productes malmesos de forma irreversible. També hi ha antioxidants endògens no enzimàtics, com el GSH, els pèptids d'histidina, proteïnes com la ferritina i la transferrina, el coenzim Q-10, la melatonina, l'urat i els grups tiols de proteïnes plasmàtiques (Pietta, 2000).

Fons exògenes

En els organismes animals, el fet que l'eficiència de les defenses antioxidants sigui incompleta, i que a més estiguin sotmesos contínuament a situacions ambientals oxidants (fum del tabac, contaminació, radiació ultraviolada, etc), fa necessari el subministrament d'antioxidants de manera exògena a partir de la dieta (Pietta, 2000). Les fruites i les

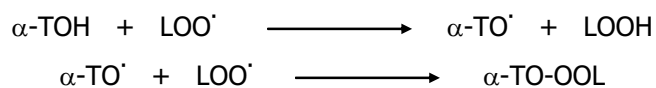
verdures són molt riques en antioxidants com ara les vitamines C, E o A. Tanmateix, moltes plantes són riques en compostos fenòlics, compostos que també tenen propietats antioxidants i que, fins i tot, poden arribar a ser més actius que altres compostos de naturalesa no fenòlica com la vitamina C (Soottbratee *et al.*, 2005).

Aquests sistemes antioxidants, però, no són enzimàtics, de manera que, a diferència dels enzims, es consumeixen en el procés i han de ser reemplaçats. És per això que l'aportació d'aquests compostos a partir de la dieta cobra una importància clau en el manteniment de l'equilibri entre ROS i antioxidants. L'origen d'aquests compostos és fonamentalment vegetal, de manera que una dieta rica en fruites, verdures, llegums i cereals assegura una bona defensa antioxidant. A més, també hi ha la possibilitat d'aconseguir aquests compostos a partir de preparats de suplementos dietètics, important en països on la dieta tradicional és pobra en vegetals.

Vitamina E (α -tocoferol)

El α -tocoferol és l'antioxidant liposoluble més abundant. Es troba en totes les membranes cel·lulars, ja que el seu caràcter lipofílic li permet situar-se a l'interior de la bicapa lipídica, on juga un paper molt important en la protecció dels lípids davant l'oxidació, evitant la formació d'enllaços covalents entre les cadenes laterals dels àcids grassos. També realitza un important paper en la modulació de la transducció de les senyals relacionades amb les ROS. A més, la vitamina E pot eliminar directament determinades ROS com ara $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ i 1O_2 (Upston *et al.*, 1999; Azzi & Stocker, 2000; Blokhina *et al.*, 2003).

El α -tocoferol (α -TOH) pot transferir un electró a un radical lliure, eliminant el radical abans que aquest pugui interaccionar amb les proteïnes de la membrana o bé iniciar la peroxidació dels lípids. Quan el α -TOH es combina amb un radical lliure, es converteix en α -TO \cdot , sent ell mateix un radical relativament estable, que pot ser reconvertit a la forma original per via enzimàtica. Per aconseguir-ho, el α -TO \cdot reacciona amb l'ascorbat produint-se MDHA i α -TOH. L'ascorbat es regenera mitjançant el cicle de l'ascorbat-glutatió (Upston *et al.*, 1999).



A més de mantenir la integritat de les membranes cel·lulars, la vitamina E inhibeix la formació de nitrosamines gràcies a la seva capacitat per a captar $NO\cdot$. També protegeix la

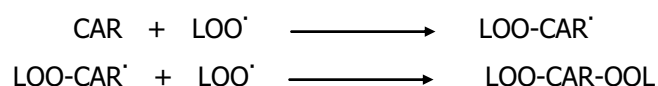
vitamina A, els aminoàcids sulfurats i la vitamina C de la seva destrucció. A més, alleugera el cansament, prevé i dissol els coàguls sanguinis, protegeix els pulmons de la contaminació, retarda l'envelliment cel·lular, accelera la cicatrització de les cremades, i ajuda a la prevenció d'avortaments espontanis. A més, és vital pel metabolisme del fetge, del teixit muscular (llis i estriat) i del miocardi. També protegeix la glàndula suprarenal del deteriorament, és essencial en la formació de fibres de col·lagen i elàstiques del teixit conjuntiu, estimula la resposta immune, protegeix de l'aterosclerosi, i la seva deficiència produeix neurodegeneració. Alguns estudis han mostrat una baixa incidència d'infeccions quan els nivells d'aquesta vitamina són elevats, i que pot inhibir la iniciació del càncer mitjançant un increment de la immunocompetència (Azzi & Stocker, 2000).

Carotens (β-carotè)

Els carotens constitueixen un nombrós grup d'antioxidants liposolubles, tot i que no són tan potents com el α-tocoferol. Molts d'ells són precursors de la vitamina A i es troben a les membranes cel·lulars o associats a lipoproteïnes. El β-carotè, que pot donar dues molècules de vitamina A, és el més estudiat. Altres carotens significatius són el α-carotè, la luteïna, el licopè i la zeaxantina (Schafer *et al.*, 2002).

L'activitat antioxidant del β-carotè es deu a la seva habilitat per a eliminar el 1O_2 , captar radicals lliures i protegir els lípids de les membranes dels efectes perniciosos de la degradació oxidativa. L'eliminació del 1O_2 implica una reacció en la qual l'energia de l'oxigen excitat és transferida al carotenoide, formant-se una molècula en estat excitat. Tot i així, la capacitat del β-carotè i altres carotenoides per a eliminar oxigen excitat és limitada, ja que el carotenoide pot patir una autooxidació durant aquest procés (Krinsky, 1993).

Els carotens, però, també són capaços d'eliminar altres ROS. En aquest sentit, el β-carotè (CAR) podria reaccionar directament amb el LOO^\cdot a baixes pressions d'oxigen, fet que podria proporcionar algun sinergisme amb la vitamina E, que reacciona amb els LOO^\cdot a elevades pressions d'oxigen.



Els carotens són necessaris pel desenvolupament dels ossos, pel manteniment de les cèl·lules de la mucosa i de la pell i, en general, per prevenir les infeccions respiratòries. El

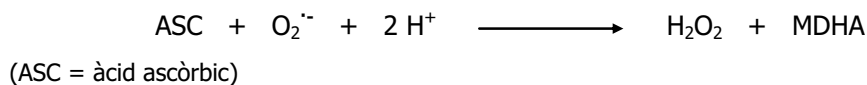
retinol ajuda a millorar la visió nocturna. La ingestió d'una baixa quantitat de carotenoides es correlaciona amb un increment en la incidència de càncer de pulmó, displàsia cervical, cataractes i malalties cardiovasculars, però una ingesta elevada (per exemple en forma de suplementes) pot produir retinopaties (Krinsky, 1998).

Vitamina C (Àcid ascòrbic)

L'àcid ascòrbic és l'antioxidant hidrosoluble més significatiu i un dels més estudiats. S'ha detectat en la majoria de les cèl·lules i òrgans, i es presenta tan en forma intra com extracel·lular. El paper de la vitamina C en la salut ha despertat molt interès. De fet, constitueix la primera línia de defensa antioxidant en el plasma davant diferents tipus de ROS. També s'ha demostrat que protegeix les LDL de manera més efectiva que la vitamina E. Hi ha evidències basades en estudis epidemiològics, que indiquen que el subministrament adient de vitamina C disminueix el risc de càncer, malalties cardiovasculars i cataractes (Noctor & Foyer, 1998; Smirnoff, 2000; Blokhina *et al.*, 2003).

Com a antioxidant, l'àcid ascòrbic és capaç de reduir un ampli ventall de compostos com l'oxigen molecular, els nitrats, els citocroms A i C, els radicals $\cdot\text{OH}$, $\text{LOO}\cdot$ i $\text{O}_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 , el HOCl, i el $^1\text{O}_2$.

La seva acció està relacionada amb la formació dels radicals MDHA i DHA, que es regeneren mitjançant el cicle de l'ascorbat-glutatió, (Noctor & Foyer, 1998). Com s'ha comentat anteriorment, la vitamina C també contribueix a la regeneració de la vitamina E donant protecció a les membranes. De fet, l'administració de vitamina C als animals condueix a un increment dels nivells plasmàtics i tissulars de vitamina E.



La vitamina C intervé en la síntesi de col·lagen i en la producció d'hormones. És important en el creixement i reparació de les cèl·lules de diferents teixits com genives, vasos sanguinis, ossos, o dents. També contribueix al metabolisme dels greixos, inhibeix la carcinogènesi per nitrosamines, i neutralitza els radicals lliures produïts pels contaminants de l'aire (O_3 , òxids nitrosos i fum de les cigarretes). Així, millora la cicatrització de les ferides, alleugera el sagnat de les genives, redueix l'efecte de moltes substàncies productores d'al·lèrgies i, en general, enforteix les defenses de l'organisme (Smirnoff, 2000; Blokhina *et al.*, 2003).

Compostos fenòlics

S'ha demostrat que les dietes riques en fruites i verdures protegeixen davant l'aparició de malalties cardiovasculars i de diferents tipus de càncer (Strandhagen *et al.*, 2000; Soobrattee *et al.*, 2005). Aquests efectes s'havien atribuït inicialment a coneguts antioxidants que es troben als aliments com el β -carotè o les vitamines C i E, però també s'ha vist que els compostos fenòlics hi juguen un paper important. De fet, els polifenols presenten un ampli ventall d'efectes biològics com a conseqüència de les seves propietats antioxidants tant en els compartiments hidròfils com lipòfils de l'organisme. Aquests compostos sovint actuen de forma sinèrgica amb la vitamina C i la vitamina E, augmentant i prolongant els beneficis d'aquestes vitamines. Als compostos fenòlics també se'ls atribueixen moltes altres propietats biològiques i farmacològiques com la interacció en la transducció de senyals, la modulació de l'expressió de gens, la quelació de metalls, beneficis en processos inflamatoris, efectes immunomoduladors, activitat antiradicalària, etc (Rice-Evans *et al.*, 1996; Vinson *et al.*, 1995; Soobrattee *et al.*, 2005). Diversos estudis han demostrat que, a més dels efectes antioxidants protectors, alguns tipus de polifenols (àcids benzoics, tanins hidrolitzables i particularment els flavonoides) tenen efectes anticarcinògens i antimutagènics, ja que poden interferir en diversos passos del desenvolupament dels tumors malignes, desactivar compostos carcinògens, inhibir l'expressió de gens mutats i l'activitat d'enzims implicats en l'activació de procarcinògens, i activar sistemes enzimàtics implicats en la desintoxicació de xenobiòtics (Bravo, 1998). Tot i així, també poden actuar com a prooxidants en determinats sistemes i condicions, de manera que cal anar en compte amb les recomanacions de suplementos alimentaris i aliments enriquits en aquest tipus de compostos, ja que tot i que quantitats correctes de compostos fenòlics són beneficiosos per la salut, grans quantitats poden resultar perjudicials (Halliwell, 2007).

1.1.3.4.- Relacions d'estructura-activitat antioxidant dels compostos fenòlics

Moltes de les accions biològiques dels compostos fenòlics son degudes a la seva activitat antioxidant. Aquesta es pot portar a terme a través de diferents mecanismes: la captació de radicals lliures, la quelació de metalls que intervenen en les reaccions de formació de ROS, la modulació de l'expressió de gens responsables de la síntesi d'enzims antioxidants, l'activació o inhibició d'enzims, i la interacció amb senyals cel·lulars (Huang *et al.*, 2005; Soobratee *et al.*, 2005).

El mecanisme més estudiat ha estat la captació de radicals lliures. Aquesta propietat depèn de l'estructura química de la molècula, ja que el principal determinant és el nombre i localització dels grups hidroxil donadors d'electrons. En donar un electró al radical lliure, la molècula es queda amb un electró desaparellat, que s'estabilitza gràcies a la deslocalització permesa pels dobles enllaços, segona característica important per l'activitat antiradicalària. Per tant, com més grups hidroxil i més dobles enllaços té la molècula, major activitat antiradicalària. Tot i així, cal tenir en compte que, particularment en la lipoperoxidació, un major nombre de grups hidroxil disminueix l'activitat antioxidant, ja que fa que la molècula sigui menys lipòfila, i resti amb més dificultat a les membranes cel·lulars (Siquet *et al.*, 2006). De fet, les relacions d'estructura-activitat han demostrat que el grup catecol és el principal determinant de l'activitat antioxidant dels fenols, fet que justifica que l'àcid clorogènic i l'àcid cafeic siguin uns antioxidants més efectius que no pas antioxidants clàssics com ara l'ascorbat (Rice-Evans *et al.*, 1996). De totes maneres, cal tenir en compte que aquests compostos per una banda presenten una activitat antioxidant, però per l'altra, una activitat prooxidant. Tot i així, hi ha dos factors que limiten el seu comportament com a prooxidants: la major estabilització de l'electró desaparellat per ressonància degut al doble enllaç de la cadena (àcid cafeic), i l'esterificació del grup carboxil terminal (àcid clorogènic). Així, l'àcid dihidrocafeic presenta una major activitat prooxidant que els àcids cafeic i clorogènic, malgrat que les propietats dels seus grups catecol siguin similars. Aquest fet permet explicar que els fenilpropanoides no es trobin normalment en forma lliure a les plantes, sinó que es presentin en forma conjugada (lligats a sucres o bé a àcids orgànics), permetent que aquests compostos es comportin, *in vivo*, preferentment com a antioxidants (Grace & Logan, 2000).

En el cas particular dels flavonoides, les estructures que afavoreixen l'activitat captadora de radicals lliures són: els grups hidroxil en les posicions 5 i 7 de l'anell A, en la 3' i 4' de l'anell B, i en la 3 de l'anell C; i el doble enllaç entre les posicions 2 i 3 de l'anell C, en conjugació amb el grup carbonil a la posició 4 de l'anell C (*Figura 1.14*) (Cos *et al.*, 1998; Soobrattee *et al.*, 2005). L'absència o la glicosilació d'algun d'aquests grups hidroxil fa disminuir la capacitat captadora de radicals lliures.

A diferència dels àcids benzoics i els hidroxicinàmics, els flavonoides, a més de captar radicals lliures també tenen la propietat d'inhibir alguns enzims responsables de la producció de ROS com la *xantina-oxidasa* (Cos *et al.*, 1998; Khlebnikov *et al.*, 2007). L'activitat inhibidora d'enzims depèn en gran mesura de la configuració de la molècula, de manera que per inhibir la *xantina-oxidasa* és bàsica una estructura coplanar (amb el doble enllaç entre les posicions 2 i 3 de l'anell C), i els grups hidroxil en les posicions 5 i 7 de l'anell A. Si hi ha grups hidroxil glicosilats en les posicions 6 i 8, l'activitat inhibidora disminueix ja que es creen interaccions estèriques (Cos *et al.*, 1998).

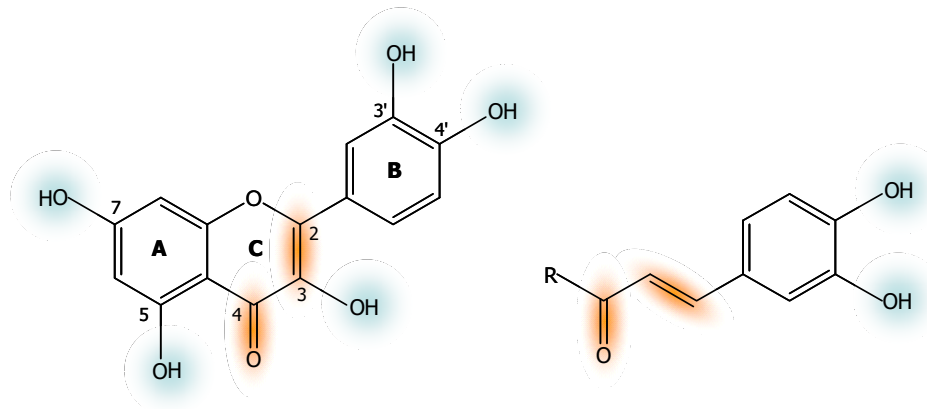


Figura 1.14.- Principals característiques moleculars importants per l'activitat antioxidant dels compostos fenòlics

1.1.4.- Els compostos fenòlics i el seu paper biològic a les plantes

A diferència dels animals, les plantes són capaces de sintetitzar compostos fenòlics en els seu metabolisme, ja que la via del siquimat només es dona en les plantes i en els microorganismes. Aquests compostos desenvolupen un paper molt important en la homeòstasi, creixement i supervivència de les plantes. Entre les múltiples funcions que porten a terme, es poden destacar les següents:

Estructural

Polímers de naturalesa fenòlica, com ara lignines i tanins condensats, s'acumulen a les parets cel·lulars, contribuint a la seva estabilització i estructura, aportant força i resistència (Humphreys & Chapple, 2002).

Pigments

Els pigments són senyals visuals per animals, que actuen com a pol·linitzadors, dispersors de llavors, etc. Juntament amb les clorofil·les, les antocianines representen el grup més important de pigments visibles a l'ull humà. Constitueixen una gran família de compostos de diferents colors, que es troben, pràcticament, en totes les parts de la planta. De fet, la majoria dels pigments de les flors són antocianines (vermelles o púrpures), però també són freqüents les auronas i xalcones (grogues) (Harborne & Williams, 2000; Kong *et al.*, 2003).

Protecció en front la llum UV

Les plantes terrestres reben grans quantitats de radiacions, que poden ser altament mutagèniques, fet que fa necessària l'existència de mesures per tal de protegir-se. Una de les respostes més generals a l'excés de radiació UV és l'activació de la transcripció dels gens de la biosíntesi de flavonoides, que són forts absorbents de la llum UV. Tot i que els fenilpropanoides com l'àcid clorogènic poden servir també com a filtres UV, el seu coeficient d'absorció de radiacions es inferior. Una barreja de flavanones, flavones i flavonols en el vacúol central de les cèl·lules epidèrmiques de les fulles serveix com a filtre protector de les cèl·lules del mesòfil, on es porten a terme els processos fotosintètics. Cal tenir en compte que els fotosistemes són molt sensibles a les radiacions UV-B. A més, aquests compostos fenòlics tenen una important activitat antimutagènica (Harborne & Williams, 2000).

Influència en el metabolisme i activitat hormonal

Alguns compostos fenòlics poden actuar com a senyal molecular en la regulació de l'activitat hormonal. Així, en la degradació de les auxines, alguns flavonoides actuen com a inhibidors i d'altres com a activadors de l'enzim *àcid indol-3-acètic-oxidasa*. A més, alguns flavonoides poden actuar com a inhibidors del transport de l'auxina àcid indol-3-acètic (AIA) a través de la membrana plasmàtica. D'altra banda, la naringenina, per exemple, és una antagonista de les gibberel·lines.

Interaccions simbiòtiques planta-microorganisme

L'exemple més destacat és la fixació de nitrogen per les plantes de la família de les Fabaceae, que es porta a terme gràcies a la simbiosi amb microorganismes fixadors de nitrogen del gènere *Rhizobium*. En aquestes plantes, gens de la biosíntesi de flavonoides són activats a les puntes de les arrels joves. Aquest fet permet la síntesi i exsudació d'una mescla de flavonoides, que són reconeguts pels microorganismes esmentats, i provoquen l'activació dels seus gens *nod*, que produiran els factors Nod. Com a resposta als factors Nod es produeix una nova síntesi de flavonoides a les arrels de la planta, que serveix per mantenir activada l'expressió dels gens *nod*, tot i que també es creu que juga un paper molt important en la inducció de la divisió cel·lular i en la formació dels nòduls, ja que els flavonoides tenen la capacitat d'inhibir el transport de les auxines i, per tant, fer decreixer la relació auxina/citoquinina, que permet la diferenciació cel·lular per la formació de teixit nodular (Waterman & Mole, 1994; Crawford *et al.*, 2000).

Interaccions entre plantes

Moltes substàncies al·lelopàtiques són compostos fenòlics. Existeixen exemples de fenols que actuen per mecanismes de volatilització (àcids benzoics), de rentat (naftoquinones, àcids benzoics i derivats), d'exsudació (àcids cinàmics, àcids benzoics) i de descomposició (tanins, derivats d'àcids cinàmics).

Interaccions entre plantes i microorganismes patògens

En la majoria dels casos, la resistència de les plantes està correlacionada amb una resposta hipersensible (HR), que es caracteritza per ser ràpida i localitzada al voltant del punt d'infecció. Aquesta resposta defensiva inclou, entre altres aspectes, un reforçament de les parets cel·lulars, mitjançant l'increment dels dipòsits de lignines i la síntesi de fitoalexines, entre les quals es troben isoflavonoides, estilbens, cumarines i àcids hidroxicinàmics conjugats com ara l'àcid clorogènic. En aquest punt es molt interessant l'acció de l'àcid salicílic com a intermediari en la transducció de la senyal. D'altra banda, però, l'acetosiringona (fenol simple secretat quan es produeix una ferida) és reconeguda pel bacteri *Agrobacterium tumefaciens*, i indueix l'expressió dels gens *vir* del microorganisme, responsables de la seva infecció (Harborne & Williams, 2000).

Interaccions entre plantes i predadors

En aquest camp es poden mencionar alguns exemples com ara els compostos fenòlics amb activitat fitoestrogènica (fonamentalment isoflavonoides com la genisteïna), els tanins (que en interaccionar amb les glucoproteïnes del predador, formen uns complexos que redueixen l'activitat dels enzims digestius), algunes prototoxines com ara la floridzina, etc. Cal esmentar també, el cas de les lignines, que redueixen la qualitat i digestibilitat dels farratges (Humphreys & Chapple, 2002; Simmonds, 2003).

Tot i així, un dels papers més destacat dels compostos fenòlics en les plantes ve donat per les seves propietats antioxidants, que justifiquen moltes de les funcions abans esmentades. Així, mitjançant la modulació de l'estrès oxidatiu, intervenen en la defensa davant diferents tipus d'estrès, tant biòtics com abiòtics, i en la modulació de diferents estats fisiològics com ara la senescència.

1.1.4.1.- Els compostos fenòlics i l'estrès oxidatiu a les plantes

Els sistemes de defensa antioxidant de les plantes actuen de forma ordenada i coordinada. Els estudis previs sobre el paper dels sistemes d'eliminació i control de les ROS

s'han enfocat cap a l'expressió dels enzims antioxidants (*SOD*, *APX*, *MDHAR*, *GR* i *catalasa*), i cap als antioxidants de baix pes molecular (ascorbat i GSH). Però com a resposta a l'estrès, també s'ha observat un increment en la síntesi de compostos fenòlics, que cal justificar (Alscher *et al.*, 1997; Foyer *et al.*, 1997).

Per a conèixer la possible significació dels compostos fenòlics com a antioxidants, cal un bon coneixement, tant de les seves fonts fisiològiques, com de la seva localització intracel·lular. En les espècies de fulla ample, el vacúol central és el principal lloc d'emmagatzematge intracel·lular de compostos fenòlics (Hutzler *et al.*, 1998). D'altra banda, durant els processos fotosintètics, el cloroplast és la principal font de radicals lliures. Sota condicions normals, aquests oxidants són eliminats en els propis cloroplasts mitjançant l'acció coordinada dels enzims *SOD*, *APX*, *MDHAR* i *GR*, però sota condicions d'estrès sever, la capacitat de neteja dels cloroplasts pot ser superada, particularment si el *pool* d'ascorbat arriba a oxidar-se (Asada, 1999). Tenint en compte que els radicals lliures no poden difondre's dels cloroplasts fins a l'interior dels vacúols, no sembla lògic que els fenols puguin actuar com a captadors primaris dels $O_2^{\cdot-}$ generats en els processos fotosintètics. Dins el cloroplast, però, aquests radicals són convertits ràpidament en H_2O_2 mitjançant mecanismes tant enzimàtics com no enzimàtics. El H_2O_2 sí que pot difondre, i pot moure's lliurement cap a l'interior del vacúol que, en les cèl·lules del mesòfil, ocupa la major part del seu volum. Estudis recents suggereixen que els nivells de H_2O_2 serveixen com a indicador de l'estat redox cel·lular, i que actuen com a inductors en l'activació transcripcional d'un gran nombre de gens lligats a l'estrès (Hirt, 2000).

Els compostos fenòlics, però, no reaccionen directament amb el H_2O_2 , sinó que s'ha proposat que actuen com a netejadors secundaris, en conjugació amb l'enzim *guaiacol-peroxidasa* (Yamasaki *et al.*, 1997; Grace & Logan, 2000).

Els compostos fenòlics han de mantenir-se en estat reduït per poder funcionar com a antioxidants efectius. Com que estan contínuament exposats a radicals lliures i als enzims oxidants, cal que hi hagi algun mecanisme capaç de mantenir un *pool* de fenols reduïts. Aquests mecanismes podrien ser enzimàtics, però no han estat identificats. De totes maneres, l'ascorbat (l'antioxidant hidròfil més significatiu de les plantes) pot actuar com a reductor químic, tan de quinones com d'hemiquinones (formes oxidades dels compostos fenòlics). Com que l'ascorbat es troba en el vacúol, pot actuar com a reductor secundari en la reacció de la *guaiacol-peroxidasa*, reciclant la forma activa de l'àcid clorogènic i d'altres substrats fenòlics, a partir de les seves respectives hemiquinones (Takahama & Oniki, 1997; Grace & Logan, 2000). L'ascorbat, al seu torn, pot ser regenerat mitjançant el cicle de l'ascorbat-glutatió (Noctor & Foyer, 1998).

Com a models il·lustratius d'aquests fets, a continuació es faran unes breus descripcions del paper dels compostos fenòlics en la modulació d'estats fisiològics (senescència) i de processos d'estrès (biòtics i abiòtics).

1.1.4.1.1.- Paper dels compostos fenòlics en la senescència

La senescència, a diferència de la HR de la planta, que es produeix de manera ràpida per evitar que s'escampi una infecció, és una mort cel·lular programada, que es dona de forma lenta per tal de recuperar el màxim de nutrients d'aquella cèl·lula. Així doncs, la mort cel·lular no és només una conseqüència de la resposta a l'estrès, sinó que també és una part fonamental en el desenvolupament de la planta. És la responsable, per exemple, de la maduració dels embrions, i dels òrgans sexuals.

La senescència es dona en les fases terminals del desenvolupament vegetal de tots els teixits i òrgans, i, tot i que normalment constitueix un procés lent, pot arribar a ser molt ràpida (per exemple les flors de *Ipomoea tricolor* duren només un dia). S'activa per determinats camins metabòlics i pot estar significativament influenciada tant per condicions ambientals, com per factors endògens (Dangl *et al.*, 2000).

Els factors iniciadors de la senescència poden ser hormonals, ambientals, de desenvolupament, o patològics. De la mateixa manera, també existeixen factors hormonals, ambientals o de desenvolupament que són inhibidors o acceleradors de la senescència (Schenk *et al.*, 2005).

En el procés de senescència es poden diferenciar tres fases, la fase d'iniciació (en que es produeix una alteració de l'equilibri redox cel·lular, del metabolisme i de les cascades de transduccions de senyals), la fase de reorganització (en que s'activen determinats camins metabòlics, es canvia el metabolisme autotròfic a heterotròfic, i es rediferencien irreversiblement diferents orgànuls), i la fase terminal (en que es produeix una acumulació d'agents antibiòtics i de ROS, s'eliminen metabòlits restants i es dona la pèrdua irreversible de la integritat i viabilitat de la cèl·lula).

Entre els canvis que es donen a l'interior de la cèl·lula durant la senescència, destaquen la pèrdua de clorofil·la i carotenoides (que es posa de manifest amb el canvi de color de fulles i fruits durant la maduració), i l'acumulació de metabòlits secundaris com antocianidines. Així per exemple, diversos autors han observat un augment de compostos fenòlics en teixits senescents (Paull *et al.*, 1985; Treutter *et al.*, 1987; Hegde & Fletcher, 1996; Sharma & Vaid, 1997). La regulació d'aquests canvis en el metabolisme resulta un important camp d'investigació, ja que poc es sap de les rutes i de les funcions de

l'acumulació d'aquests metabòlits (Kandil *et al.*, 2004). D'altra banda, el metabolisme oxidatiu hi juga un paper clau, ja que s'ha demostrat un augment de ROS en les cèl·lules senescentes, i s'ha postulat la seva intervenció en els estadis finals de la senescència (Dangl *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2000).

En la senescència es donen, doncs, una sèrie de canvis importants en el transcriptoma de la planta, activant-se diversos factors de transcripció, molts dels quals estan regulats per molècules de senyalització cel·lular com l'àcid salicílic, l'àcid jasmònic, o l'etilè (Morris *et al.*, 2000; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Schenk *et al.*, 2005; Miao & Zentgraf, 2007).

1.1.4.1.2.- Estrès biòtic i les ROS a les plantes

En les plantes, els processos metabòlics aeròbics com la respiració i la fotosíntesi porten inevitablement a la producció de ROS, concretament als mitocondris, als cloroplasts i als peroxisomes. Aquestes ROS són principalment $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 i 1O_2 , i com s'ha dit anteriorment, tenen la capacitat de causar dany oxidatiu a proteïnes, lípids i DNA. Aquestes propietats citotòxiques expliquen l'evolució de complexos mecanismes de detoxificació. Tot i així, existeixen evidències que indiquen que aquestes ROS també funcionen com a senyals cel·lulars en la regulació del desenvolupament de la defensa envers agents patògens (Apel & Hirt, 2004).

En condicions fisiològiques, les plantes produeixen ROS contínuament com a subproductes de diferents camins metabòlics. A les plantes, destaquen com a enzims productors de ROS la *NADPH-oxidasa* (similar a la dels neutròfils dels mamífers), que catalitza la producció de $O_2^{\cdot-}$, *peroxidases* lligades a la paret cel·lular (productores de $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2), i les *diamina* i *poliamina-oxidases* (productores de H_2O_2) entre d'altres. Entre els mecanismes de defensa envers aquestes espècies en les plantes trobem els enzims *SOD*, *APX*, *catalasa*, i *GPX*, però també existeixen diferents sistemes no enzimàtics com els compostos fenòlics, l'àcid ascòrbic, el α -tocoferol, el GSH o els carotenoides (*Taula 1.3*) (Mittler, 2002).

Mecanisme	Localització	ROS primària
Producció		
Fotosíntesi	Cloroplast	$O_2^{\cdot-}$
Respiració	Mitocondri	$O_2^{\cdot-}$
<i>NADPH-oxidasa</i>	Membrana plasmàtica	$O_2^{\cdot-}$
β -oxidació dels àcids grassos	Peroxisoma	H_2O_2
<i>Oxalat-oxidasa</i>	Apoplast	H_2O_2
<i>Xantina-oxidasa</i>	Peroxisoma	$O_2^{\cdot-}$
<i>Peroxidases</i> de la paret cel·lular	Paret cel·lular	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2
<i>Diamina</i> i <i>poliamina-oxidasa</i>	Apoplast	H_2O_2
Neutralització		
<i>SOD</i>	Cloroplast, citosol, mitocondri, peroxisoma, apoplast	$O_2^{\cdot-}$
<i>APX</i>	Cloroplast, citosol, mitocondri, peroxisoma, apoplast	H_2O_2
<i>Catalasa</i>	Peroxisoma	H_2O_2
<i>GPX</i>	Citosol	H_2O_2
Àcid ascòrbic	Cloroplast, citosol, mitocondri, peroxisoma, apoplast	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, 1O_2
GSH	Cloroplast, citosol, mitocondri, peroxisoma, apoplast	H_2O_2
α -tocoferol	Membranes	$LOOH$, 1O_2
Carotenoides	Cloroplast	1O_2

Taula 1.3.- Principals mecanismes de producció i neutralització de ROS a les plantes (Mitter, 2002) En el grup d'elements neutralitzants de les ROS caldria afegir, però, els compostos fenòlics, ja que tot i que l'autor no els ha considerat, la seva activitat captadora de ROS pot ser, fins i tot, més potent que la de l'àcid ascòrbic o el α -tocoferol.

D'altra banda, però, les plantes produeixen ROS de manera diferent com a resposta a atacs per part de patògens. Una de les respostes més immediates és l'anomenada "explosió oxidativa" (*oxidative burst*), que consisteix en un ràpid increment de ROS (principalment de H_2O_2 i $O_2^{\cdot-}$). Aquest ràpid increment de ROS es veu facilitat pel fet que els enzims responsables de la detoxificació d'aquestes ROS, com són la *APX* o la *catalasa*, són inhibits pel NO^{\cdot} i l'àcid salicílic. Així doncs, ens trobem en una situació en que augmenten les ROS al mateix temps que disminueixen les defenses antioxidants que les neutralitzen, donant lloc a un increment de ROS molt ràpid. Quan un insecte herbívor mossega el teixit vegetal d'una planta, li provoca una ferida, que fa que s'activin *oxidases* localitzades a la membrana plasmàtica o a l'apoplast, i es produeixin, així, radicals $O_2^{\cdot-}$, altament tòxics, que ajuden a combatre el patògen invasor. D'altra banda, el $O_2^{\cdot-}$ és ràpidament transformat a H_2O_2 que, a diferència del $O_2^{\cdot-}$, és capaç de travessar la membrana plasmàtica, donant com a resultat el ràpid increment de H_2O_2 en les cèl·lules vegetals del voltant de la ferida. Aquest

H₂O₂ actua com a missatger induint l'expressió de gens involucrats en la defensa envers ferides, com els que codifiquen enzims implicats en la mort cel·lular programada (mecanisme similar a l'apoptosi dels mamífers), que impedeix que l'àrea de la ferida i la infecció s'estenguin per la resta de la planta (*Figura 1.16*). Aquesta "explosió oxidativa" no només es dona a nivell local, sinó que pot activar-se, un temps més tard, una segona "explosió oxidativa" en altres zones distals de la infecció, donant lloc a una espècie d'immunitat sistèmica (Bi & Felton, 1995; Wojtaszek, 1997; Álvarez *et al.*, 1998; Apel & Hirt, 2004).

1.1.4.1.3.- Estrès abiòtic i les ROS a les plantes

Darrerament, l'estrès abiòtic ha adquirit una gran importància a causa de les grans pèrdues de producció que ocasiona en els camps de cultiu. Aquestes pèrdues, a part de la important reducció dels beneficis econòmics, suposen un perill d'insuficiència d'abastament de la població, sobretot tenint en compte el canvi climàtic que s'està produint (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007).

Dins l'estrès abiòtic s'inclouen diferents factors com la salinitat, l'excés o deficiència d'aigua, el O₃, altes o baixes temperatures, l'excés de llum i metalls pesats, etc. Aquests factors són capaços de fer variar les respostes fisiològiques i bioquímiques de les plantes, així com els equilibris cel·lulars hídrics i iònics. Aquests canvis donen lloc a l'aparició de metabòlits tòxics, a la desorganització de les membranes cel·lulars, a la inhibició de la fotosíntesi i a l'alteració dels processos d'adquisició de nutrients (Sreenivasulu *et al.*, 2007). Tots aquests canvis poden activar mecanismes de resistència de la planta, que portaran a la seva supervivència, o bé, si la planta és susceptible, a la seva mort. Els factors que determinen la resistència o susceptibilitat de la planta venen determinats per característiques de l'estrès (severitat, duració, nombre d'exposicions, combinació de diferents estressos) i de la pròpia planta (òrgan o teixit afectat, estadi de desenvolupament, genotip, etc) (*Figura 1.15*) (Bray *et al.*, 2000).

Moltes d'aquestes alteracions es donen com a conseqüència de l'augment de ROS que suposa l'estrès oxidatiu amb el qual estan interrelacionats aquests estressos abiòtics. Així, un excés de llum dona lloc a la fotoinhibició del fotosistema II en el procés de la fotosíntesi, que provocarà un dràstic augment de l'espècie ¹O₂. El tancament dels estomes mitjançant per l'àcid abscísic (ABA) durant la sequera és activat per determinades ROS, i els processos de gravitropisme també són produïts per l'activació de determinats gens per part d'algunes ROS. Així doncs, l'estrès oxidatiu és clau en els efectes ocasionats per l'estrès abiòtic (Apel & Hirt, 2004; Baxter *et al.*, 2007).

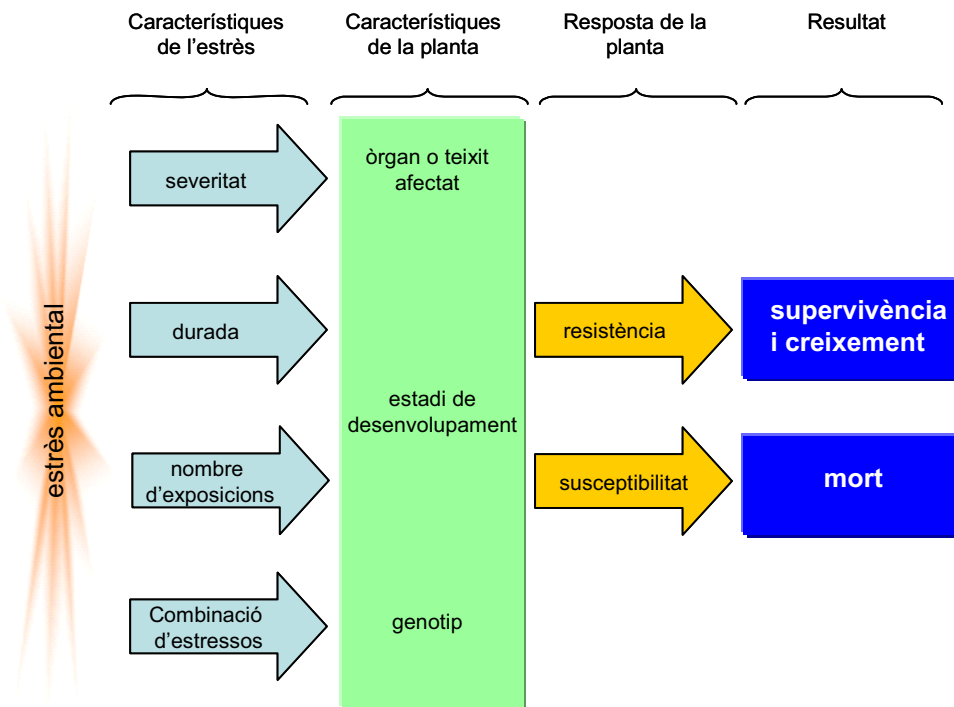


Figura 1.15.- Esquema de la resposta de la planta a l'estrès ambiental (Adaptació de Bray *et al.*, 2000)

Les ROS, especialment el radical $\cdot\text{OH}$, són altament destructives de diferents molècules com lípids, àcids nucleics i proteïnes, i quan les defenses cel·lulars no són capaces de neutralitzar-les, acaba produït-se la mort cel·lular. Però a part del seu paper destructiu, aquestes ROS són capaces de portar a terme diferents accions dirigides a la defensa de la planta en resposta a l'estrès. Si en la defensa envers l'atac de patògens es donava una inhibició de la síntesi d'enzims detoxificants (veure *apartat 1.1.4.1.2.*), en l'estrès abiòtic el paper de les ROS és oposat, ja que precisament activen la síntesi d'aquests enzims (*Figura 1.16*). Aquesta diferència pot ser deguda al fet que, en aquest cas, la producció de ROS es dona principalment en el cloroplast i al mitocondri, llocs de transport electrònic, on un augment de ROS per sobre de nivells tòxics activa els mecanismes de captació d'aquestes espècies per tal que es produeixi una detoxificació cel·lular (Apel & Hirt, 2004).

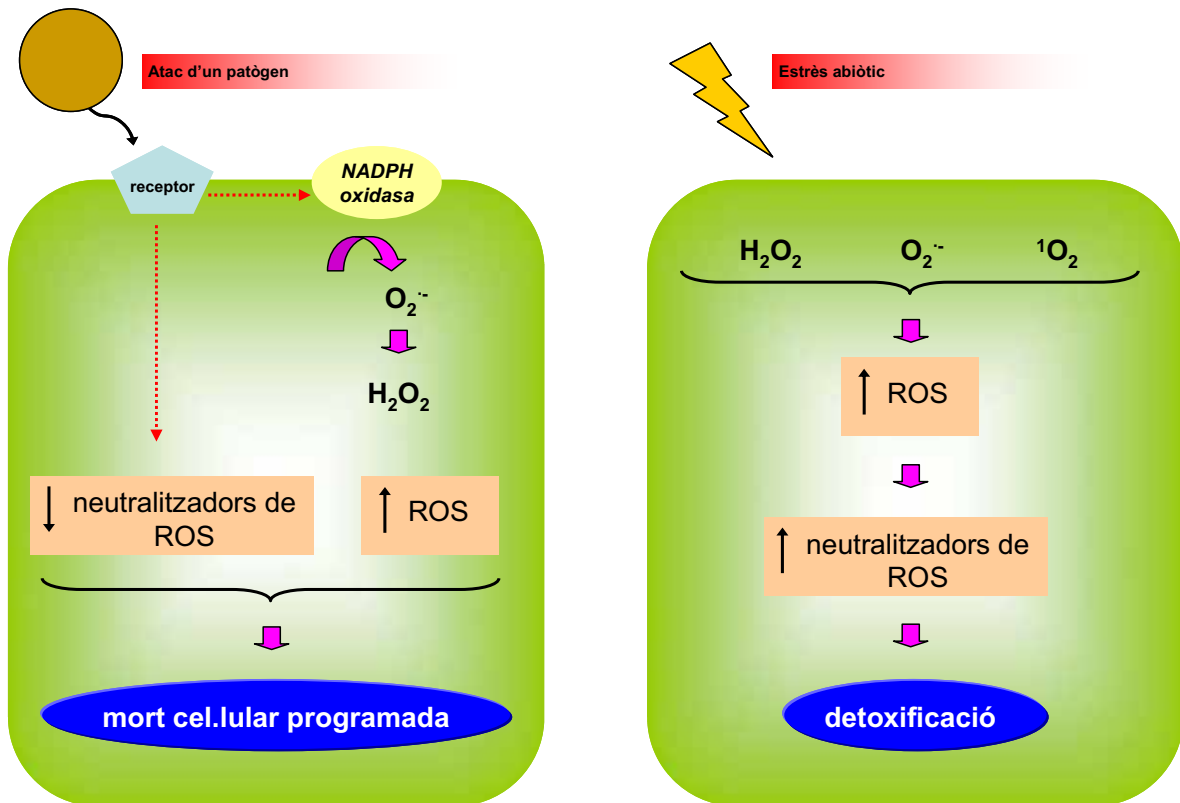


Figura 1.16.- Comportament de les ROS en les situacions d'estrès biòtic i abiòtic (Adaptació d'Apel & Hirt, 2004)

L'estrès oxidatiu, però, ocasiona molts més canvis en les plantes que sovint han estat passats per alt (Baxter *et al.*, 2007). Es sap, per exemple que els enzims del cycle dels àcids tricarboxílics són inhibits per una acció oxidativa (Sweetlove *et al.*, 2002), i que d'altres proteïnes es modifiquen, perdent fins i tot la seva funció (Hancock *et al.*, 2005; Moller & Kristensen, 2006).

Darrerament, s'ha començat a fer estudis dels canvis en el metaboloma de les plantes com a conseqüència de l'estrès oxidatiu. En aquest sentit, s'han detectat increments dels nivells de metabòlits lligats a la ruta de la glucòlisi, especialment de les hexoses-fosfat. Aquests nivells elevats corresponen a una disminució de l'activitat enzimàtica d'aquest cycle, amb la corresponent inhibició de la formació dels metabòlits precursors de la síntesi d'aminoàcids, necessaris per la generació de noves proteïnes. També es detecten una disminució dels transcrits que codifiquen els enzims responsables de la formació de les poliamines putrescina i espermidina (Baxter *et al.*, 2007). Així, per exemple, els nivells elevats de sacarosa induïts per l'estrès hídric podrien proveir la cèl·lula d'una energia addicional per sobreviure en condicions de manca d'aigua (Burke, 2007).

1.1.4.1.4.- El paper dels compostos fenòlics en l'estrès biòtic i abiòtic

Els compostos fenòlics contribueixen de manera decisiva a la defensa envers patògens. Per exemple, les quinones generades per *polifenol-oxidases* (*PPO*) han demostrat ser potents dissuasius alimentaris limitant l'accessibilitat d'insectes herbívors a proteïnes vegetals i inhibint els seus enzims digestius (Pourcel *et al.* 2007). A més, la polimerització d'alcohols hidroxicinàmics mitjançant les *PPO* té un important paper en la formació d'una barrera física de lignina que impedeix la penetració de patògens (Dixon *et al.*, 2005).

Altres mecanismes pels quals els compostos fenòlics contribueixen a la defensa de la planta envers l'estrès biòtic són l'activació directa de gens de resistència a patògens, i l'actuació com a missatgers secundaris i com a mediadors de la HR de la planta (ràpida activació de reaccions de defensa de la cèl·lula com a resposta a un patògen, que porta a la mort cel·lular), on els àcids salicílic i benzoic hi tenen un paper destacat (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

L'àcid salicílic i el seu glucòsid també intervenen en la inducció de la resistència sistèmica adquirida (SAR), un tipus de resistència d'ampli espectre, que es dona com a conseqüència de l'atac d'un patògen en teixits i òrgans distants del lloc d'infecció (Chong *et al.*, 2001; Hammond-Kosack & Jones, 2000; Verberne *et al.*, 2002). Tot i així, el paper exacte d'aquest mediador encara es desconeix, ja que hi ha autors que afirmen que és probable que no sigui l'àcid salicílic el senyal per conferir la SAR a llarga distància (Zeier, 2005). Tanmateix, el seu paper en la inhibició de la *catalasa*, i per tant en l'augment de H_2O_2 , com a conseqüència d'infeccions, sembla ben acceptat (Takahashi *et al.*, 1997; Hammond-Kosack & Jones, 2000). D'altra banda, l'àcid salicílic també s'acumula en resposta a l'estrès abiòtic produït per O_3 i radiació UV (Yalpani *et al.*, 1994).

S'ha demostrat l'acumulació de compostos fenòlics en els teixits de les plantes en diferents situacions d'estrès abiòtic. Per exemple, l'estrès causat per baixes temperatures s'ha vist traduït en un increment en la concentració d'antocianines en plantes de patata; la llum té un paper destacat en la inducció de la biosíntesi de fenilpropanoides, com demostra l'augment d'àcid clorogènic en arrels de patata o l'envermelliment de les fulles de *Mahonia repens* com a conseqüència de l'acumulació d'antocianines a l'epidermis; i l'estrès hídric induïx un increment en la síntesi de flavonoides en fulles d'arròs (Logan *et al.*, 1998; Reyes & Cisneros-Zevallos, 2003; Ithal & Reddy, 2004).

El paper dels compostos fenòlics en les situacions d'estrès abiòtic és multifactorial. Per una banda actuen com a captadors de ROS produïdes en l'estrès oxidatiu com a conseqüència de l'estrès abiòtic, a més de prevenir la seva formació quelant metalls (Pourcel

et al., 2007). D'altra banda, gràcies a la seva capacitat d'absorbir la radiació UV, també s'ha postulat que actuen com a protectors d'aquesta radiació en les plantes, ja que diferents estudis han demostrat una disminució de la resistència envers la radiació UV en plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana* en les quals s'havia desactivat els enzims responsables de la síntesi d'antocianines (Li *et al.*, 1993; Kliebenstein, 2004). A més, els compostos fenòlics també poden actuar com a senyals i missatgers secundaris, activant i desactivant determinats gens involucrats en la resistència a l'estrès.

1.1.4.2.- Els compostos fenòlics i les poliamines

1.1.4.2.1.- Concepte, metabolisme i funció de les poliamines

Les poliamines són compostos nitrogenats de baix pes molecular, que són presents en tots els organismes vius. La presència dels grups amino fa que aquests compostos es trobin protonats a pH fisiològic, de manera que es solen unir a molècules carregades negativament, com àcids nucleics, fosfolípids, proteïnes, etc. Les poliamines putrescina, espermidina i espermina són les més abundants a la naturalesa (*Figura 1.17*), tot i que la cadaverina i l'agmatina també són freqüents en algunes espècies vegetals. Les quantitats en que es troben en els organismes varien, en gran mesura, en funció de les condicions ambientals i de l'espècie vegetal en concret, però aproximadament van de concentracions micromolars a milimolars (Galston & Sawhney, 1990; Walters, 2003).

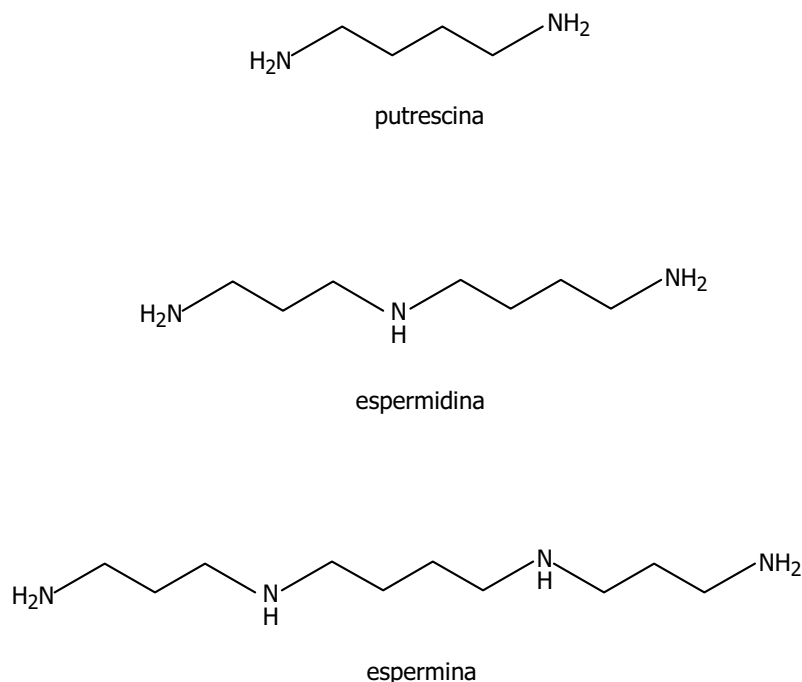


Figura 1.17.- Estructura química de les poliamines més abundants

Les poliamines són necessàries pel desenvolupament normal tant de les cèl·lules procariotes, com de les eucariotes. En les plantes participen en processos com el creixement de les arrels, l'embriogènesi somàtica, la iniciació floral i el desenvolupament de flors i fruits. Així mateix, també estan implicades en diferents processos de resposta a estrès biòtic i abiòtic (Galston *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1997).

La síntesi de les poliamines en els animals i en la majoria de fongs es fa a partir de l'ornitina, via *ornitina-descarboxilasa* (*ODC*), donant com a resultat la diamina putrescina. En les plantes i bacteris existeix, a més, una via alternativa a partir de l'arginina, via *arginina-descarboxilasa* (*ADC*), donant com a resultat final, després de diferents intermediaris, la putrescina. La posterior formació d'espermidina i espermina es fa mitjançant l'addició d'un grup aminopropil a la putrescina i a l'espermidina, respectivament. Aquestes reaccions estan catalitzades pels enzims *espermidina-sintasa* (*SpdS*) i *espermina-sintasa* (*SpmS*). El grup aminopropil prové de la descarboxilació de la *S*-adenosilmetionina (SAM), gràcies a l'acció de l'enzim *S*-adenosilmetionina-descarboxilasa (*SAMDC*). D'altra banda, la cadaverina es forma a partir de l'aminoàcid lisina, mitjançant l'enzim *lisina-descarboxilasa* (*LDC*) (Tiburcio *et al.*, 1997; Walters, 2003; Kuznetsov *et al.*, 2006) (Figura 1.18).

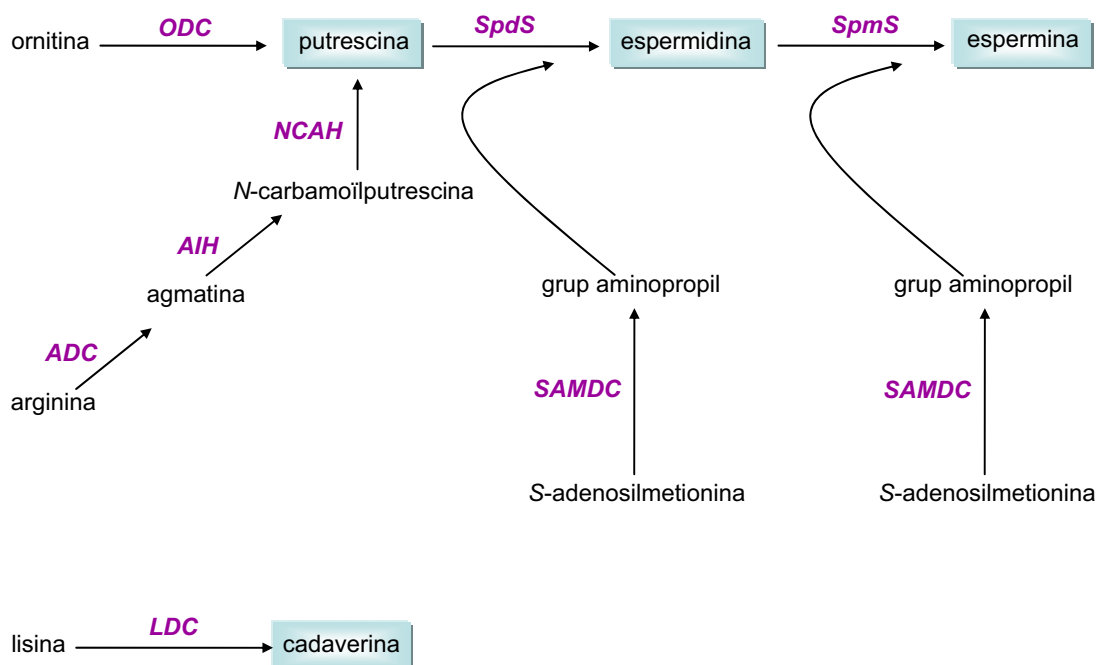


Figura 1.18.- Biosíntesi de les principals poliamines en les plantes. *ODC*, *Ornitina-descarboxilasa*; *ADC*, *Arginina-descarboxilasa*; *LDC*, *Lisina-descarboxilasa*; *SpdS*, *Espermidina-sintasa*; *SpmS*, *Espermina-sintasa*; *AIH*, *Agmatina-iminohidrolasa*; *NCAH*, *N-Carbamoilputrescina-amidohidrolasa*; *SAMDC*, *S-Adenosilmetionina-descarboxilasa* (Adaptat de Tiburcio *et al.*, 1997 i Kusano *et al.*, 2007).

Els enzims *ODC* i *ADC* tenen localitzacions cel·lulars diferents. Mentre que el *ODC* es localitza en el nucli cel·lular tal com passa en animals, l'enzim *ADC* es situa en les membranes dels tilacoides dels cloroplasts (Bortolotti *et al.*, 2004). D'altra banda, la formació de putrescina per la via *ADC* es sol associar a les respostes de la planta en situacions d'estrès, de manera que en aquestes condicions, les poliamines sintetitzades en aquesta segona localització poden establir els complexos fotosintètics de les membranes tilacoidals (Kuznetsov *et al.*, 2006).

El fet que la sobreexpressió dels enzims *ODC* i *ADC* porti a un marcat augment dels nivells de putrescina, però no d'espermidina o espermina, fa pensar que la regulació de la formació d'aquestes dues poliamines a partir de la putrescina, es troba sota control homeostàtic (Bhatnagar *et al.*, 2001; Alcázar *et al.*, 2005).

En el catabolisme de les poliamines intervien *diamina-oxidases* (que contenen Cu^{2+} i oxiden la putrescina i la cadaverina) i *poliamina-oxidases* (que contenen una flavoproteïna, i oxiden l'espermidina i l'espermina), donant com a resultat ROS (com H_2O_2), grups NH_4^+ , i àcid γ -aminobutíric (GABA), que passarà al cicle de Krebs. La producció de H_2O_2 pot ser força important en determinades ocasions, contribuint a "l'explosió oxidativa" i a la conseqüent mort cel·lular programada que es dona en la resposta a l'atac per patògens (Cowley & Walters, 2002; Yoda *et al.*, 2006). A més, les poliamines també poden intervenir en aquesta "explosió oxidativa", juntament amb el Zn^{2+} a través de la modulació de la producció de O_2^- per la *NADPH-oxidasa* de la membrana cel·lular, tot i que encara no està clar el mecanisme d'aquesta modulació (Cuevas *et al.*, 2004). D'altra banda, el GABA, que s'acumula ràpidament en condicions d'estrès, és un potencial modulador de diferents processos fisiològics. Aquesta acumulació dona lloc a la formació de glutamat via el cicle de Krebs, que al seu torn accelera la biosíntesi de poliamines (Kuznetsov *et al.*, 2006).

El paper de les poliamines a les plantes ha estat extensament estudiat. S'ha demostrat que són essencials en el procés de creixement, així com en el control de la morfogènesi de determinats òrgans i teixits vegetals sota determinades condicions (Tiburcio *et al.*, 1990). Així, mitjançant la inhibició de la síntesi de poliamines amb difluormetilarginina (DFMA), s'ha pogut inhibir el creixement cel·lular i l'elongació de plantes d'arròs i tomàquet, i de fongs. La DFMA i la difluormetilornitina (DFMO) són anàlegs estructurals dels aminoàcids arginina i ornitina, respectivament, en que s'ha substituït l'hidrogen del carboni alfa per un grup difluorometil, de manera que es combinen irreversiblement amb els centres actius dels enzims *ADC* i *ODC*, impeding la unió amb l'arginina i l'ornitina, donant com a resultat una disminució de la síntesi de putrescina i del creixement. De fet, la DFMO va ser sintetitzada originalment en el procés de recerca de la teràpia antineoplàsica, i, tot i que de moment els

resultats no són concloents, es segueixen fent estudis clínics. Tot i així, es recomana aquest fàrmac com a coadjuvant en la teràpia anticancerígena

(National Cancer Institute,

<http://www.cancer.gov/search/ResultsClinicalTrialsAdvanced.aspx?protocolsearchid=3083750>).

El paper de les poliamines en la senescència ha estat força discutit. S'ha vist, per exemple, que el contingut en poliamines, així com l'activitat dels enzims *ADC* i *ODC*, d'òrgans i teixits joves és superior al d'òrgans i teixits senescents. També s'ha vist com la inoculació de poliamines exògenes en teixits vegetals prevé de l'aparició dels símptomes de la senescència (Galston & Sawhney, 1990; Sood & Nagar, 2003). De fet, s'han proposat diferents mecanismes pels quals aquestes poliamines poden retardar la senescència. D'una banda, tenen capacitat per estabilitzar i protegir les membranes cel·lulars, de manera que poden evitar la pèrdua de clorofil·la a través de les membranes til·lacoidals que es dona en la senescència (Besford *et al.*, 1993). D'altra banda, poden retardar la degradació de la clorofil·la mitjançant la inhibició de *peroxidases* (Sood & Nagar, 2003), i inhibir la síntesi d'etilè (Chen & Kao, 1991).

Darrerament, s'ha estudiat la capacitat de les poliamines d'unir-se a àcids nucleics, i modular, d'aquesta manera, l'expressió de gens. En aquest sentit s'apunta que les poliamines nuclears són principalment l'espermidina i l'espermina, ja que degut a la disposició dels grups amino, tenen millor interacció amb el DNA, i millor capacitat de protecció envers les *endonucleases* nuclears. Així, s'ha observat que les poliamines tenen la capacitat d'inhibir la degradació mitjançada per *endonucleases* del lligand internucleosomal del DNA, induïda per determinades preparacions anticancerígenes, obrint d'aquesta manera, un nou camp d'investigació del paper de les poliamines com a possibles agents antiapoptòtics (Kuznetsov *et al.*, 2006).

La intervenció de les poliamines en els processos de cascades de transducció de senyals intracel·lulars també apunta cap a una possible funció com a missatgers secundaris, ja que diferents estudis mostren la participació de l'espermidina i l'espermina en la mobilització del Ca^{2+} intracel·lular (interrompent cadenes de senyalització que porten a l'activació d'enzims com la *PAL*), i en l'activació de la *fosfolipasa C* (Messiaen & Van Cutsem, 1999; Echevarría-Machado *et al.*, 2004).

Recents investigacions han estudiat el paper de les poliamines en la modulació dels canals iònics cel·lulars animals, i han demostrat la seva capacitat per bloquejar canals dependents de cations, amb el següent ordre de potència: espermina > espermidina >> putrescina. Aquests estudis s'han estès, també, al món vegetal, demostrant, per exemple, el

bloqueig dels canals vacuolars catiónics de plantes de cibada per part de poliamines intracel·lulars. La investigació dels canvis que poden generar aquests compostos en la homeostasi a través del bloqueig dels canals iònics cel·lulars és un dels reptes que està prenent més força actualment en la recerca sobre poliamines (Kusano *et al.*, 2007).

El paper de les poliamines com a antioxidants també ha estat àmpliament discutit. Així, es senyalen l'espermidina i l'espermina com a eficients antioxidants, protegint el DNA de l'acció oxidativa de les ROS. Aquesta capacitat antioxidant pot ser deguda a la capacitat de neutralitzar ROS com $O_2^{\cdot-}$ o $\cdot OH$ (Cohen, 1998; Ha *et al.*, 1998, Bray *et al.*, 2000).

A més, s'ha suggerit que l'espermina (que, a diferència de la putrescina i l'espermidina, ha demostrat no ser essencial en el creixement i desenvolupament de la planta) té un important paper en la síntesi de NO^{\cdot} , ja que n'és una potent inductora. En aquesta activitat, l'espermidina resulta menys potent, i la putrescina és inactiva (Kusano *et al.*, 2007).

Les poliamines també tenen un paper destacat en processos d'estrès, tant biòtic com abiòtic. S'ha observat el seu augment en infeccions virals, i la seva contribució a "l'explosió oxidativa". En aquest sentit, es senyala l'espermidina com a principal poliamina responsable de l'augment de H_2O_2 en la HR, ja que, a diferència de la putrescina i l'espermina, s'acumula a l'apoplast (Kusano *et al.*, 2007).

Tanmateix, tot i que l'estrès abiòtic ha estat poc estudiat, plantes d'*Arabidopsis thaliana* mutades amb incapacitat per sintetitzar espermina han demostrat ser més sensibles a situacions d'estrès hídric i salí, i a l'inrevés, plantes de tabac amb sobreexpressió de l'enzim *ODC* han demostrat un augment de la tolerància a aquest estrès (Alcázar *et al.*, 2006b; Yoda *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2006; Kusano *et al.*, 2007). També s'ha observat un augment de la tolerància a la sequera en plantes d'arròs sobreexpressores de *ADC*, i, mentre que aquestes, en condicions normals, tenen una alta concentració de putrescina, en condicions d'estrès augmenten l'espermidina i l'espermina. Aquest fet porta a pensar que els compostos que realment protegeixen de l'estrès siguin l'espermidina i l'espermina, tot i que no es sap amb certesa quina d'aquestes tres poliamines juga el paper principal, i es creu que depèn de l'espècie vegetal i del tipus d'estrès (Capell *et al.*, 2004). En el mecanisme pel qual les poliamines actuen com a protecció dels estressos abiòtics existeixen dues hipòtesis, d'una banda es parla de la seva activitat neutralitzadora de ROS comentada, i de l'altra, es proposa la seva actuació com a molècules de senyalització cel·lular (Alcázar *et al.*, 2006b).

1.1.4.2.2.- Els conjugats de poliamines amb àcids hidroxicinàmics. Característiques i funció

Les poliamines es solen unir covalentment a diversos tipus de molècules. Aquestes molècules poden ser d'alt pes molecular com proteïnes o àcids nucleics, o bé de baix pes molecular, de les quals les més freqüents són els àcids hidroxicinàmics, que donen lloc a les amides d'àcids hidroxicinàmics (HCAA) (*Figura 1.19*). Aquestes unions covalents es formen a partir de l'activació del grup carboxil dels àcids hidroxicinàmics amb un grup acetil-CoA, i la posterior incorporació al grup amino de la poliamina mitjançant una *transferasa* específica de cada poliamina: *putrescinahidroxicinamoil-transferasa* (*PutHT*), *espermidinahidroxicinamoil-transferasa* (*SpdHT*), i *esperminahidroxicinamoil-transferasa* (*SpmHT*) (Walters, 2003; Kuznetsov *et al.*, 2006).

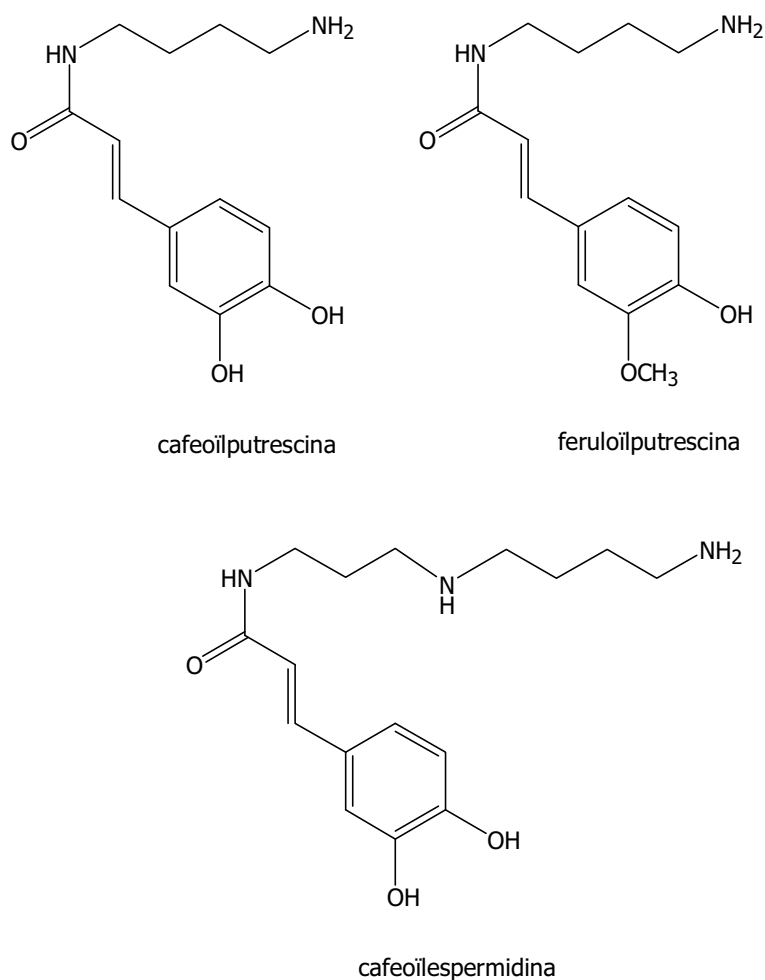


Figura 1.19.- Exemples de poliamines conjugades a àcids hidroxicinàmics

Aquesta conjugació de les poliamines resulta important en el control de les concentracions intracel·lulars de poliamines, i en la seva interacció amb elements de la paret cel·lular com ara lignines i hemicel·luloses. Alguns autors afirmen que també podrien contribuir al transport de poliamines, així com servir de substrat d'*amino-oxidases* i *amino-peroxidases* (Kuznetsov *et al.*, 2006).

A aquests compostos se'ls atribueix un seguit de funcions biològiques. Existeixen diferents evidències del seu paper destacat en la floració, tal com demostra la seva acumulació en teixit meristemàtic de flors i fruits i no en teixits vegetatius, la disminució del seu contingut després de la floració, o l'acumulació de nivells anormals de poliamines lliures en mutants estèrils de plantes de tomàquet (Cohen, 1998; Facchini *et al.*, 2002). Una altra propietat destacada està relacionada amb l'adaptació de la planta a l'estrès, tot i que hi ha controvèrsia respecte el seu paper. D'una banda, s'ha proposat que la conjugació d'àcids hidroxicinàmics amb poliamines disminueix la toxicitat dels àcids hidroxicinàmics lliures, amb propietats antifúngiques, ja que s'ha observat que cultius de plantes de canya de sucre amb una conjugació d'àcids hidroxicinàmics amb poliamines augmentada, són més sensibles a una infecció per fongs que les plantes normals. D'altra banda, altres autors els atorguen propietats inhibidores de la germinació d'espores de fongs (Legaz *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 2001).

S'ha observat, també, que les HCAA estan implicades en la resistència a infeccions virals, ja que es dona una correlació positiva entre l'acumulació de HCAA i la resistència a aquests patògens. S'ha postulat que els mecanismes pels quals desenvolupen la seva acció són la inhibició de la replicació viral, i la inducció de la mort cel·lular programada en la HR, que podria estar induïda per l'espermidina sense la dependència de l'àcid salicílic (Walters, 2003).

D'altra banda, també s'ha proposat la seva participació en la resistència a diferents estressos abiòtics, ja que per exemple, s'ha observat la seva acumulació en situacions d'estrès per fred (Jin *et al.*, 2003).

Tot i que el contingut d'aquests conjugats en condicions d'estrès és contradictori, ja que depèn en gran mesura de l'espècie vegetal i del contingut d'àcids hidroxicinàmics i de poliamines com a substractes, les seves propietats antioxidants són reconegudes, sent superiors a les de les poliamines lliures. Així, s'ha proposat aquest mecanisme com a sistema de defensa per contrarestar els possibles danys cel·lulars derivats de la situació d'estrès, ja que, com s'ha apuntat anteriorment, tant l'estrès biòtic com l'estrès abiòtic porten a una situació d'estrès oxidatiu (Kuznetsov *et al.*, 2006).

Així com s'ha vist que les poliamines lliures disminueixen en els processos de senescència, i que, al contrari, els compostos fenòlics augmenten, no s'han trobat referències respecte la relació de les HCAA i la senescència. Així doncs, constitueixen un grup de metabòlits secundaris amb funcions i comportament encara poc estudiats en les diferents situacions biològiques de les plantes.

1.2.- Alcaloides

1.2.1.- Generalitats dels alcaloides

1.2.1.1.- Concepte d'alcaloide

Els alcaloides constitueixen un dels grups de metabòlits secundaris més diversos, tant per la seva varietat estructural i biosintètica, com per les seves activitats farmacològiques.

El terme alcaloide prové de l'àrab *al-qali* (sosa) i del grec *eidōs* (aspecte), i va ser introduït per Carl Meissner al 1819 per definir substàncies bàsiques d'origen vegetal. Així, els alcaloides es definien originàriament com a compostos d'origen vegetal, que contenen nitrogen, de caràcter bàsic, i amb propietats farmacològiques. Malgrat que aquesta definició encara és vàlida en molts casos, en d'altres no resulta del tot adequada, ja que encara que els alcaloides han estat tradicionalment aïllats de plantes, fonamentalment en dicotiledònies, també se n'han trobat en alguns animals superiors, insectes, invertebrats marins i microorganismes.

Actualment es considera que els alcaloides són compostos orgànics naturals, de caràcter generalment bàsic, que contenen un o més àtoms de nitrogen formant part d'un heterocicle, que biogenèticament deriven d'aminoàcids, i que, llevat de poques excepcions, presenten un ampli ventall de propietats farmacològiques.

Aquesta definició, però, encara resta un pèl ambigua, ja que existeixen alguns compostos considerats tradicionalment com alcaloides que no compleixen totes les característiques. Per això, s'ha introduït els termes de pseudoalcaloide per anomenar aquells que no deriven d'aminoàcids (com els alcaloides terpènics o els derivats de policètids), i de protoalcaloide per anomenar aquells en els quals el nitrogen no és heterocíclic (com l'efedrina, la gramina o la mescalina) (Croteau *et al.*, 2000; Máñez & Giner, 2003).

El primer alcaloide va ser identificat al 1806 per Friedrich Setürner, a partir de l'anàlisi dels components individuals de l'opi. Les propietats narcòtiques de l'opi ja eren conegudes des de l'antiguitat, per això aquesta primera substància aïllada va ser anomenada morfina, en honor a Morpheus, el déu grec dels somnis. Posteriorment es van anar aïllant molts altres alcaloides com a principis actius de drogues, i actualment es poden comptabilitzar més de 12.000 alcaloides (Wink, 1998a; Croteau *et al.*, 2000).

La principal font d'alcaloides són les angiospermes, on quasi el 20% de les espècies contenen aquests compostos. Dins les monocotiledònies, són freqüents en les famílies Amaryllidaceae i Liliaceae, però es concentren majoritàriament en les dicotiledònies. Dins les dicotiledònies, els alcaloides es troben en major proporció en les famílies més primitives (Menispermaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Berberidaceae) o en les més evolucionades (Apocynaceae, Loganiaceae, Solanaceae, Rubiaceae), i disminueix la proporció en les famílies intermèdies. De totes maneres, la majoria d'alcaloides presenta selectivitat quimiotaxonòmica, i cada grup estructural es sol localitzar en una mateixa família, o en famílies pròximes taxonòmicament.

La biosíntesi d'alcaloides està regulada per factors ambientals i sovint induïda per fitopatògens, ions de metalls pesants, radiacions UV o ferides. En molts casos, a més, requereix un cert grau d'especialització cel·lular. Un cop sintetitzats, els alcaloides poden ser transportats i emmagatzemats en altres parts de la planta i poden acumular-se en determinats òrgans com llavors (*Strychnos nux-vomica* L.), fruits (*Piper nigrum* L.), fulles (*Atropa belladonna* L.), bulbs (*Narcissus pseudonarcissus* L.) i escorces (*Cinchona pubescens* Vahl.). Dins la cèl·lula, els alcaloides es solen localitzar en els vacuols, i es poden trobar, fonamentalment, en forma de sals d'amoni quaternari, *N*-òxids i/o conjugats.

El contingut en alcaloides de les plantes pot ser molt variable, amb un marge de concentració que va de mg/Kg fins a un 8% del pes sec. Aquest contingut, però, tampoc és constant en la mateixa planta, ja que varia en funció de la fase del cicle biològic, de les condicions ambientals, etc. Pot variar, fins i tot, en un mateix dia (Wink & Roberts, 1998).

Entre les seves propietats físico-químiques destaquen el fet que solen ser sòlids blancs i cristal·lins. La seva solubilitat depèn del pH de la solució: en l'estat de base lliure són solubles en dissolvents orgànics de polaritat mitjana o baixa, mentre que en medi àcid es protonen formant sals hidrosolubles. Tots són solubles en alcohols, i la basicitat de l'alcaloide depèn de la disponibilitat del parell d'electrons de l'àtom de nitrogen, de manera que els substituents electrodonadors adjacents al nitrogen augmenten la seva basicitat (com per exemple l'efedrina), mentre que els electroatracients la disminueixen (colquicina).

La funció dels alcaloides en les plantes es considera que és, d'una banda, defensiva envers patògens, insectes, etc, i de l'altra, de senyalització cel·lular. Així, molts alcaloides són tòxics per insectes o altres animals, dissuadint-los d'alimentar-se a partir d'aquella planta que els ha sintetitzat. Alguns provoquen només molèsties o tenen un gust amarg desagradable, però d'altres poden resultar mortals. També existeixen alcaloides amb propietats antimicrobianes com la quinina, activa en front el virus X de la patata (Wink, 1998b).

Malgrat la seva basicitat, els alcaloides tenen un gran ventall de propietats farmacològiques, de les quals destaquen les que afecten al sistema nerviós central, particularment a l'acció dels neurotransmissors (per exemple la morfina és depressora). També hi ha alcaloides que afecten el sistema nerviós autònom, com l'efedrina amb acció simpàticomimètica, o l'atropina amb acció anticolinèrgica. D'altra banda, també existeixen alcaloides amb acció curaritzant com la tubocurarina, antifibril·lant com la quinidina, o antitumoral com la vincristina i la vinblastina.

Gràcies a aquestes propietats farmacològiques, els alcaloides tenen un gran interès terapèutic. Molts d'ells s'utilitzen directament com a fàrmacs, i molts d'altres serveixen de matèria primera per a la semisíntesi, o de model estructural per a la síntesi completa d'anàlegs amb millors propietats (amb un increment d'activitat i selectivitat, millora de la biodisponibilitat, disminució de la toxicitat, etc) (Máñez & Giner, 2003).

1.2.1.2.- Classificació

Deixant a part els pseudoalcaloides, els alcaloides deriven d'una o diverses molècules d'aminoàcids, tot i que alguns poden tenir, també, carbonis addicionals. Així, els alcaloides derivats d'aminoàcids es poden classificar segons l'aminoàcid precursor en els següents grups (Máñez & Giner, 2003):

Derivats de l'ornitina, la lisina i l'àcid nicotínic (àcid aspàrtic)

Dins aquest grup es troben els alcaloides pirrolidínics, pirrolizidínics, tropànics, piperidínics, quinolizidínics i piridínics.

Derivats de la fenilalanina i la tirosina

Aquí es troben les feniletilamines, els alcaloides isoquinolínic, els benziltetrahidroisoquinolínic i els alcaloides de les Amaryllidaceae, entre d'altres.

Derivats de l'àcid antranílic i el triptòfan

En aquest grup s'inclouen els alcaloides quinolínic, quinazolínics i indòlics en general.

Derivats de l'histidina

Aquí s'inclouen els alcaloides imidazòlics.

1.2.2.- Alcaloides de les Amaryllidaceae

1.2.2.1.- Característiques generals

La família Amaryllidaceae té la particularitat que presenta un grup exclusiu d'alcaloides, anomenats alcaloides de les Amaryllidaceae, que estan presents en tots els gèneres d'aquesta família. Aquests constitueixen un nombrós grup d'alcaloides derivats de la fenilalanina i la tirosina, la major part dels quals no està present en cap altra família botànica. El primer alcaloide aïllat en aquesta família va ser la licorina, al 1877 en l'espècie *Narcissus pseudonarcissus*. Tot i que s'ha portat a terme un gran progrés en la investigació de les plantes d'aquesta família i dels seus alcaloides, encara queda molt camp d'estudi, ja que a més de la investigació de la composició alcaloïdica de espècies no estudiades, les noves tècniques en la recerca de molècules bioactives poden fer possible, també, el descobriment de nous alcaloides presents en baixes concentracions en plantes prèviament estudiades.

Fins el moment, s'han aïllat més de 300 alcaloides de plantes de la família Amaryllidaceae. Tot i que les seves estructures poden variar considerablement, aquests alcaloides estan relacionats biogenèticament. El fet que s'hagi aïllat, de forma puntual, un alcaloide d'aquest tipus en una altra família (crinamida en l'espècie *Dioscorea dregeana* (Dioscoreaceae)) i alcaloides d'altres tipus en plantes de la família Amaryllidaceae, ha posat darrerament sota debat, l'actual definició d'alcaloides de les Amaryllidaceae (Bastida *et al.*, 2006).

Com que la presència d'alcaloides en les plantes és el resultat d'un procés d'adaptació del sistema de defensa de la planta envers agents patògens, la presència d'un grup particular d'alcaloides en aquesta família podria ser deguda al fet que aquests alcaloides estiguin relacionats amb el cicle de desenvolupament, ja que les Amaryllidaceae tenen el major creixement a principis de primavera, moment en que altres espècies de plantes tot just estan començant a néixer.

Les espècies de la família Amaryllidaceae presenten una variació ontogènica dels seus alcaloides. Tot i que es disposa de pocs estudis al respecte, sembla ser que durant el període vegetatiu el bulb té una proporció d'alcaloides inferior a la de la part aèria, i en el moment en que la flor ha estat fecundada, aquests es transporten cap al bulb. S'ha vist, per exemple, que després de la fecundació de les flors, la pseudolicorina s'acumula en forma de derivats acetilats en els bulbs de *Narcissus assoanus*. Els alcaloides també s'acumulen en més quantitat en els teixits més vulnerables, fet que recolza la idea que els alcaloides actuen com a sistema de defensa. D'altra banda, factors com l'estrès, ferides o atacs d'insectes

també poden fer variar la composició alcaloídica, ja que aquests factors provoquen una hidròlisi dels alcaloides emmagatzemats en forma de conjugats, i una posterior oxidació i mobilització (Bastida *et al.*, 2006).

1.2.2.2.- Classificació i biosíntesi

Els alcaloides de les Amaryllidaceae es poden classificar en 9 subgrups segons el seu tipus d'esquelet (Figura 1.20). Així, trobem alcaloides de les Amaryllidaceae tipus Norbelladina, Licorina, Homolicorina, Crinina, Hemantamina, Narciclasina, Tazetina, Montanina i Galantamina. El sistema de numeració és el proposat per Ghosal *et al.*, 1985a.

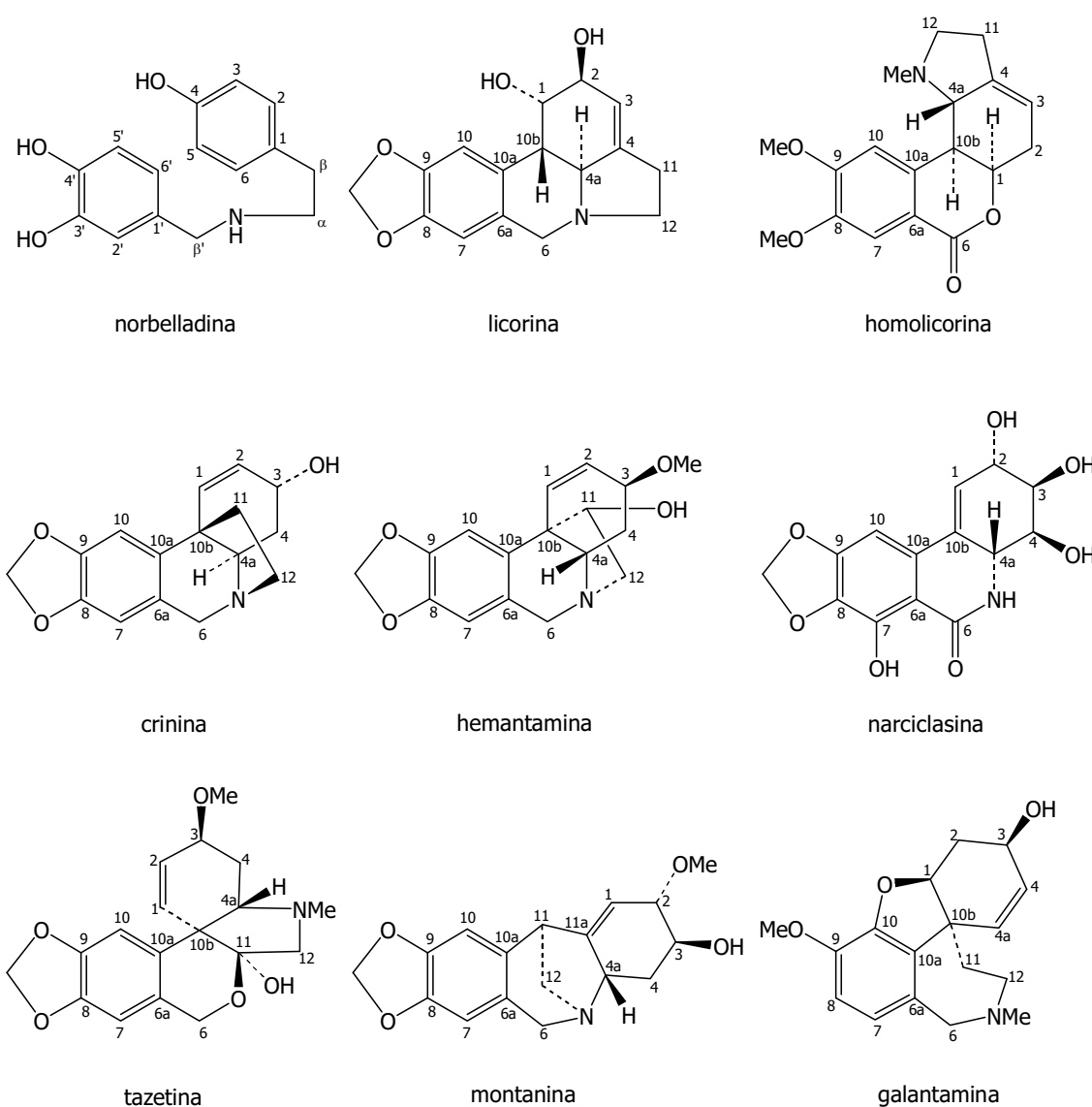


Figura 1.20.- Tipus d'alcaloides de les Amaryllidaceae

La biosíntesi d'aquests alcaloides és el resultat de diferents tipus d'acoblements fenol-oxidatius del precursor comú norbelladina o del derivat 4'-*O*-metilnorbelladina tal com mostra la *Figura 1.21*. Aquests precursors provenen de la condensació de dos derivats dels aminoàcids fenilalanina i tirosina. A partir de la L-fenilalanina s'obté un aldehyd protocatèquic per la via dels àcids cinàmics, i a partir de la L-tirosina s'obté la tiramina mitjançant una descarboxilació. L'aldehyd protocatèquic i la tiramina es condensen formant una base de Schiff, que per reducció donarà lloc, finalment, a la norbelladina o el seu derivat (Dewick, 2002; Herrera Velázquez, 2001).

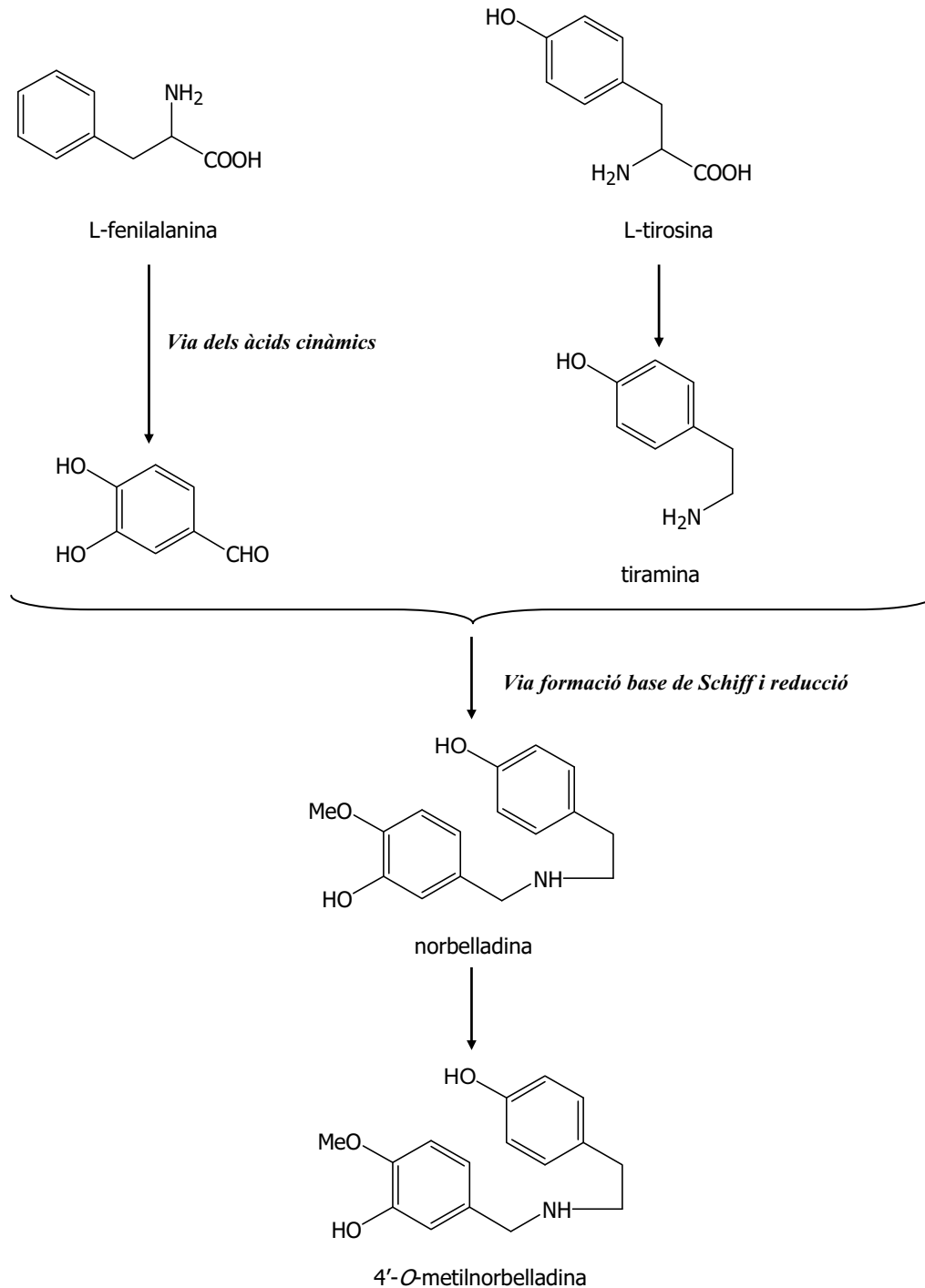


Figura 1.21.- Biosíntesi d'alcaloides de les Amaryllidaceae

A partir de la 4'-*O*-metilnorbelladina s'originaran els diferents tipus d'alcaloides segons el tipus d'acoblament fenol oxidatiu (*orto-para'*, *para-para'*, o *para-orto'*) (Figura 1.22).

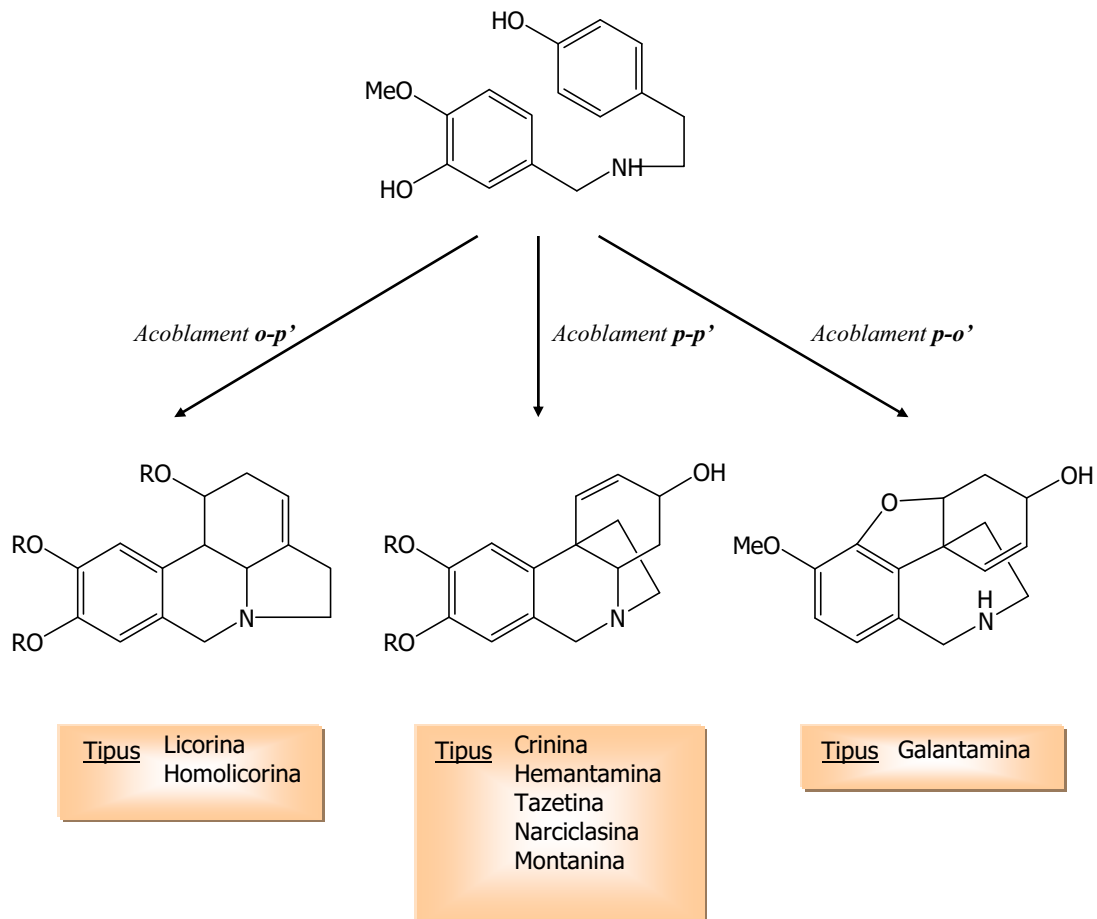


Figura 1.22.- Tipus d'acoblament fenol oxidatiu en la biosíntesi dels diferents grups estructurals d'alcaloides de les Amaryllidaceae

1.2.2.3.- Accions farmacològiques

Les plantes de la família de les Amaryllidaceae s'han utilitzat durant milers d'anys com a plantes medicinals, però no ha estat fins als darrers anys que han estat objecte de la investigació química i farmacològica. Moltes de les seves propietats farmacològiques són degudes als seus alcaloides, molts dels quals han pogut ser aïllats i la seva activitat biològica investigada. Existeix un ampli ventall d'efectes fisiològics d'aquest tipus d'alcaloides, entre els que destaquen una activitat antitumoral, antiviral, inhibidora de l'*acetilcolinesterasa*,

immunoestimuladora, i antimalàrica. Aquestes propietats fan que aquests compostos tinguin un interès particular pel seu potencial ús en la teràpia clínica. De fet, la galantamina (alcaloide majoritari en les espècies del gènere *Leucojum*, *Cyrtanthus* i *Galanthus* entre d'altres) presenta activitat anticolinesteràsica i es comercialitza com a principi actiu pel tractament pal·liatiu de la malaltia de l'Alzheimer, sota el nom comercial de Reminyl® i, tot i que s'ha sintetitzat químicament, la seva obtenció actual segueix realitzant-se principalment per extracció a partir de les escasses poblacions naturals de *Leucojum aestivum*, que resulten del tot insuficients. Tot i així, l'aïllament de grans quantitats d'aquests alcaloides a partir de material vegetal no resulta massa rentable, ja que es troben en baixa quantitat. Tanmateix, la seva utilització en la síntesi i semisíntesi de nous fàrmacs o anàlegs amb millors propietats, resulta de gran interès (Máñez & Giner, 2003; Bastida *et al.*, 2006). L'activitat biològica d'alguns dels alcaloides de la família Amaryllidaceae identificats en l'espècie *Pancratium canariense* es troben resumits a la *Taula 1.4* (Bastida & Viladomat, 2002).

Alcaloide	Activitat
Caranina	<ul style="list-style-type: none"> • Analgèsic feble • Convulsiu i hipotensor • Inhibidor de l'<i>acetilcolinesterasa</i> • Actiu contra la leucèmia linfofítica P-388 (en forma d'acetilcaranina)
Galantamina	<ul style="list-style-type: none"> • Potent analgèsic (potència comparable a la morfina) • Anticonvulsiu • Hipotensor • Inductor d'hipotèrmia en rates • Inhibidor de l'<i>acetilcolinesterasa</i>, amb efectes farmacològics centrals i perifèrics (ús en el tractament de l'Alzheimer) • Atenua o reverteix els dèficits cognitius induïts per drogues i lesions en models animals. • Agonista nicotínic no competitiu • Reverteix la depressió respiratòria induïda per opiacis. • Antagonitza la paràlisi muscular induïda per la α-tubocurarina i el bloqueig ganglionar, i incrementa la resposta contràctil. • Efectes perifèrics i centrals en la forma de bromhidrat: <ul style="list-style-type: none"> - Antagonitza la depressió respiratòria induïda pels derivats morfínics. - Reverteix els efectes de la intoxicació per escopolamina. - Ecurça la latència i incrementa la densitat del REM. - Reverteix el bloqueig neuromuscular produït pels relaxants musculars del tipus curare (ús en postoperatoris per contrarestar els efectes de l'anestèsia, i en el tractament de desordres neurològics com la paràlisi, la miastènia gravis, o les distròfies musculars progressives).

	<ul style="list-style-type: none"> • Afecta la contracció del múscul esquelètic. • Incrementa la resistència durant l'exercici i retarda l'aparició de la fatiga (comercialitzada com a Energix®). • Citotòxic en cèl·lules LMTK • Té una biodisponibilitat del 90% després de l'administració oral, i una vida mitja plasmàtica de 6 hores. • Produeix intoxicació a nivell digestiu (nàusees i vòmits), respiratori, neuromuscular i de sistema nerviós central; fins al moment no s'ha demostrat toxicitat hepàtica.
<i>N</i> -formilnorgalantamina	<ul style="list-style-type: none"> • Citotòxic moderat en el limfoma Molt 4 i en l'hepatoma HepG2 • Citotòxic en cèl·lules LMTK
Galantina	<ul style="list-style-type: none"> • Analgèsic • Hipotensor • Citotòxic feble en cèl·lules limfoides Molt 4
Hipeastrina	<ul style="list-style-type: none"> • Antiviral. Actiu contra l'<i>Herpes simplex</i> tipus I • Dissuasiu alimentari • Significativament actiu contra les línies cel·lulars LNCaP i HT • Citotòxic en cèl·lules LMTK • Citotòxic lleu en cèl·lules limfoides Molt 4
Licorina	<ul style="list-style-type: none"> • Emètic • Analgèsic • Antiinflamatori • Estimulant respiratori, expectorant. Utilitzat en el tractament de la bronquitis i l'asma bronquial • Relaxant en artèries pulmonars pre-tractades amb epinefrina • Augmenta la contractilitat i el ràtio de perfusió coronària, a través de l'estimulació dels receptors β-adrenèrgics. • Inhibidor específic de la biosíntesi d'àcid ascòrbic a través de la inhibició de la <i>L-galactono-γ-lactona-deshidrogenasa</i> (molts dels efectes fisiològics de la licorina sembla ser que són deguts a aquesta inhibició) • Inhibidor de la respiració resistent al cianur • Inhibidor de l'augment de <i>peroxidases</i> • Potent inhibidor del creixement i divisió cel·lular en plantes superiors, algues i llevats, a través de la inhibició del cicle cel·lular en la interfase • Inhibidor de la divisió cel·lular de fibroblasts de rata • Inductor de morfologia llisa en els fibroblasts transformats K-ras-NRK • Inhibidor de la síntesi proteica, a través del bloqueig de la formació de l'enllaç peptídic • Inhibidor del creixement de plantes per la inhibició de la síntesi proteica • Antitumoral moderat (Es creu que el mecanisme és a través de la inhibició de la síntesi proteica a nivell del ribosoma) • Inhibidor de creixement viral a través de la inhibició de la síntesi proteica

del propi virus. No afecta l'activitat de la *transcriptasa inversa*. Actiu en diversos virus DNA i RNA

- Inhibidor de la síntesi de DNA (És capaç de distingir les cèl·lules que contenen DNA mitocondrial de les que no en contenen, inhibint el creixement només de les primeres)
- Citotòxic en diverses línies de cultius cel·lulars
- Inhibidor del creixement de cèl·lules HeLa
- Antimalàric
- Antiprotozoari feble
- Inhibidor de la germinació de llavors i del creixement d'arrels (La 1- $O\beta$ -D-glucosil-licorina té l'efecte invers, i presenta activitat mitogènica en cèl·lules animals)
- El seu metabòlit ungeremina és responsable, en part, dels efectes citotòxics i inhibidors del creixement de la licorina. Algunes bactèries poden transformar la licorina en pancrasidina, metabòlit menys tòxic que la ungeremina.
- Paper en els mecanismes protectors i reparadors en resposta a l'estrès de les plantes que el sintetitzen
- Insecticida

Narwedina

- Hipotensor
- Augmenta l'amplitud i la freqüència respiratòria.
- Augmenta l'amplitud i disminueix la freqüència de les contraccions cardíques.
- Disminueix els efectes narcòtics de l'etanol i els barbitúrics.
- Incrementa els efectes analgèsics de la morfina.
- Protegeix de la intoxicació per tiopental.
- Augmenta els efectes de la cafeïna, nicotina, corazol i arecolina.
- Agent potencial pel tractament de l'Alzheimer

Pseudolicorina

- Actiu en la leucèmia murina de Rausher
 - Inhibidor de la síntesi proteica de cèl·lules tumorals mitjançant la inhibició de la formació de l'enllaç peptídic (Té un lloc d'unió al centre de la *peptidil-transferasa* de la subunitat 60S del ribosoma diferent al de la licorina)
 - Disminueix la síntesi de DNA, sense pràcticament alterar la de RNA.
 - Citotòxic en cèl·lules Molt 4 i en cèl·lules LMTK
 - Moderadament actiu en l'hepatoma HepG2
 - Inhibidor del creixement de cèl·lules HeLa
 - Antiviral (Actiu en *Herpes simplex* de Tipus I i en virus RNA neuròtrofs. No inhibeix l'activitat de la *transcriptasa inversa*)
-

Vitamina	<ul style="list-style-type: none">• Analgèsic feble en ratolins• Augmenta l'efecte analgèsic de la morfina.• Taquicàrdic en gossos
----------	--

Taula 1.4.- Activitats biològiques d'alguns dels alcaloides identificats en les plantes de *Pancreatium canariense*. Molt 4, limfoma humà infantil; LMTK, fibroblasts murínics alveolars no tumorals; HepG2, línia cel·lular derivada d'hepatoma humà; LNCaP, línia cel·lular derivada de carcinoma de pròstata humà; HT, línia cel·lular derivada de carcinoma de vesícula urinària; K-ras-NRK, cèl·lules de ronyó de rata transformades amb el virus del sarcoma murí de Kirstein; HeLa, línia cel·lular derivada de carcinoma de cèrvix huma; REM, etapa del son de moviment ocular ràpid.

2.1.- Obtenció del material vegetal

2.1.1.- *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur, Lamiaceae (lavandí)

El lavandí (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur, Lamiaceae) és un híbrid espontani entre la *Lavandula angustifolia* Mill. i la *Lavandula latifolia* Medic.. Les espècies d'espígol són originàries de les costes mediterrànies, concretament de l'oest mediterrani. El seu aprofitament per part de l'home es remunta als temps dels antics romans, on ja eren utilitzades per conservar la roba blanca i per perfumar els banys. A partir de l'Edat Mitjana es va començar a cultivar l'espígol per obtenir els olis essencials de les seves flors, però va ser a partir del segle XIX que es va desenvolupar el seu cultiu a gran escala, sobretot a la zona de la Provença, que va adquirir una gran popularitat gràcies a aquest cultiu i a la indústria de la perfumeria que va portar al darrera. Posteriors estudis van demostrar que el lavandí tenia una major proporció d'aromes i un creixement més ràpid que les dues espècies d'espígol de les quals procedeix, així doncs, el seu cultiu sistemàtic va prendre relleu cap als anys 1950. Actualment els principals productors de lavandí són França, Espanya i Bulgària.

El lavandí és un petit arbust perenne, de fulles lineals d'un color verd-grisós. La inflorescència és en forma d'espiga, i les flors, que consten d'una corol·la amb 5 pètals soldats a la base en forma de tub, són d'un color porpra intens. El calze té 5 sèpals igualment soldats. Les tiges són quadrangulars, i el fruit consisteix en 4 grans. L'època de floració és la primavera. La seva apreciada fragància prové dels olis essencials, que es fabriquen en glàndules incrustades als petits pèls que cobreixen les flors i les tiges (Meuiner, 1992).

La hibridació de la *L. angustifolia* Mill. i la *L. latifolia* Medic. es dona de forma espontània a través dels insectes (sobretot les abelles), que transporten el pol·len d'una espècie a l'altra, donant lloc a la formació de llavors de lavandí. El lavandí, però, és estèril, de manera que la seva propagació es fa per esqueixos, tant de les parts aèries com de les arrels (Meuiner, 1992).

Les propietats medicinals de l'espígol són ja conegudes des de l'antiguitat, i actualment apareix a la farmacopea europea com a "flor d'espígol" i com a "oli essencial d'espígol". Està indicat tant el seu ús intern (pel malestar associat als estats d'intranquil·lilitat i agitació, l'insomni, trastorns funcionals de l'aparell digestiu, migranyes, o tos) com l'extern (per combatre l'acne, el reumatisme, per fer massatges, com a perfum, etc). Les parts utilitzades de la planta són les fulles, les tiges i les flors (Lis-Balchin & Hart, 1999; European Pharmacopoeia Commission, 2004).



Figura 2.1.- Imatge d'una mata de lavandí

El lavandí es cultiva de manera intensiva en zones mediterrànies principalment per a l'obtenció dels seus olis essencials, que són àmpliament utilitzats en la fabricació de perfums, sabons, cosmètics, ambientadors, etc. Aquests olis són incolors o lleugerament grocs, i s'obtenen per destil·lació. Mesclats amb alcohol i altres essències donen lloc a l'aigua d'espígol, també molt utilitzada en perfumeria (Dronne *et al.*, 1999; Charles *et al.*, 2002). La composició d'aquests olis ha estat ben estudiada en els darrers anys, i s'ha caracteritzat mitjançant tècniques de cromatografia de gasos (GC) i cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS). Així, els compostos que formen part dels olis essencials han estat identificats, fonamentalment, com a monoterpens i altres compostos volàtils de baix pes molecular (Shellie *et al.*, 2002; Morgan *et al.*, 2006).

Els exemplars de lavandí utilitzats en el present treball van ser cultivats en camps experimentals a Cetina (Saragossa), en condicions agronòmiques controlades. Les parts aèries van ser recol·lectades durant l'època de floració, i posteriorment, a nivell de planta pilot, es van destil·lar els olis essencials a la planta experimental La Alfranca (Saragossa), de la Diputació General d'Aragó. Aquest procés de destil·lació, amb corrent de vapor, es va portar a terme segons un protocol estàndard del *Ministerio de Agricultura, Pesca i Alimentación*. Després de la destil·lació, el material va ser assecat, triturat i emmagatzemat a 4°C.

2.1.2.- *Nicotiana tabacum* L., Solanaceae (tabac)

La planta de tabac (*Nicotiana tabacum* L.) pertany a la família de les Solanaceae, una família complexa i diversa, que representa la tercera família en importància des del punt de vista econòmic. En concret, el cultiu de *Nicotiana tabacum* té un pes important en l'economia de molts països lligat a la indústria tabaquera. D'altra banda, el tabac també juga un paper important com a sistema model en la biotecnologia de les plantes, ja que és fàcilment transformable. Aquest fet fa que sigui un sistema experimental idoni per a la realització d'estudis pilot per la creació de nous transgènics. A més, presenta una gran quantitat de biomassa, que fa possible la seva utilització per a la producció en massa de diferents substàncies com fàrmacs, vacunes, etc. D'altra banda, també s'utilitza en la recerca dels principis de la resistència de les plantes a malalties, i de la síntesi de metabòlits secundaris. Però malgrat la seva extensa utilització i els avantatges que presenta, el seu estudi genètic encara està en els estadis inicials. Aquest fet es deu bàsicament a que, a diferència de l'*Arabidopsis thaliana*, el tabac té un genoma molt gran amb moltes de les parts repetides, ja que es tracta d'una espècie tetraploide amb $n=24$ cromosomes. No ha estat fins recentment, amb la creació de The Tobacco Genome Initiative (<http://tgi.ncsu.edu/index.html>), que s'han agrupat esforços per fer una caracterització del seu genoma. Aquesta iniciativa té per objectiu la màxima identificació d'aquest genoma, i actualment ja es disposa d'un primer esborrany que pot servir d'esquelet per a l'anàlisi complet del genoma del tabac (Bindler *et al.*, 2007).

Per l'obtenció del material vegetal de tabac necessari per la realització del present treball experimental, es varen sembrar llavors de *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin en un substrat compost per una barreja de turba, perlita i vermiculita (2:1:1), en una cambra de cultiu a 22°C de temperatura i 70% d'humitat, amb un fotoperíode de 8 hores de llum d'una intensitat de $190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, seguides de 16 de fosc.

Per avaluar els metabòlits secundaris en teixits senescents, un grup de plantes es va deixar créixer fins a 24 setmanes, moment en que es van recol·lectar mostres de teixit de les fulles de la part superior de les plantes, d'un color verd intens i turgents (com a mostra-control de teixit jove, **TU**) i de les fulles de la part inferior de les mateixes plantes, d'un color groc pàl·lid i de textura pansida (com a mostra-control de teixit senescent, **TD**). Les mostres van ser congelades immediatament en nitrogen líquid i es van emmagatzemar a -80 °C, per tal d'inactivar qualsevol activitat enzimàtica que pogués alterar el perfil metabòlic del material.

Per avaluar l'efecte de l'estrès hídric en el perfil metabòlic, es van deixar créixer noves plantes de tabac fins a 3 setmanes després de la germinació. En aquest moment es va deixar de regar un grup de plantes (**TE**), que va correspondre a les mostres amb estrès hídric, mentre que el grup que es va seguir regant va correspondre a les mostres control (**TC**). Al cap de 3 setmanes més es van recol·lectar mostres de fulles dels dos grups de plantes (**TE** i **TC**). El material va ser, de la mateixa manera, congelat immediatament en nitrogen líquid i emmagatzemat a -80°C .



Figura 2.2.- Il·lustració d'una planta de tabac

2.1.3.- *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.), Brassicaceae

L'*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. és una petita planta de la família Brassicaceae. Es tracta d'una herba anual, de 2 a 60 cm d'alçada, amb fulles basals el·líptiques formant una roseta, i amb fulles lanceolades més petites al llarg de la tija. Les flors són petites i blanques, i les llavors, també petites, són de color vermell-marronós i el·lipsoïdes. La seva època de floració i de desenvolupament del fruit és de gener a juny, i el seu hàbitat són zones obertes com prats i ribes de rius. Creix en sòls arenosos, tot i que també se'n pot trobar en vessants muntanyoses rocoses i sota matolls. Pot viure entre el 0 i els 4250 m d'alçada (Al-Shehbaz & O'Kane, 2002).

L'*Arabidopsis thaliana* s'ha pres com a planta model en nombrosos estudis del metabolisme de les plantes, ja que presenta una sèrie d'avantatges com són un temps de generació curt, una mida petita, una alta taxa de descendència, i un genoma nuclear relativament petit, que ha permès la seva completa seqüenciació. Aquest fet ha facilitat l'obtenció d'exemplars amb modificacions genètiques i, a través de la proteòmica i la metabolòmica, l'estudi de funcions específiques dels diferents gens. Les implicacions d'aquests descobriments no només són rellevants en el camp de la biologia molecular, sinó també en la indústria agrícola, la biologia de l'evolució, la bioinformàtica, la química combinatòria, i la medicina molecular (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Per exemple, la seqüenciació d'aquest genoma ha permès la identificació dels gens involucrats en la síntesi de les poliamines (Alcázar *et al.*, 2006b).

Una particularitat de l'*Arabidopsis thaliana* és l'absència de l'enzim *ODC*, de manera que la síntesi de poliamines es porta a terme exclusivament a través de l'enzim *ADC*. Només s'ha detectat, de moment, un altre organisme eucariota que presenti aquesta particularitat, el protozou *Trypanosoma cruzi* (Hummel *et al.*, 2004). Tot i així, en l'*Arabidopsis* existeixen dos gens que codifiquen per l'enzim *ADC*, el gen *ADC1* i el gen *ADC2*. Aquests dos gens no s'expressen de la mateixa manera en les mateixes condicions, ja que la planta no té l'enzim *ODC* que actua en diferents condicions que el *ADC* en les altres plantes. Així, l'especialització dels gens *ADC1* i *ADC2* en l'*Arabidopsis* adquireix una especial rellevància. En aquest sentit, el gen *ADC1* mostra una activitat transcripcional elevada en condicions de fred, mentre que l'activitat transcripcional de *ADC2* és superior en les etapes de germinació de llavors i de desenvolupament d'arrels i fulles. També s'ha observat que *ADC2* és induït en diferents situacions d'estrès abiòtic com ara la sequera, la deficiència de K^+ , l'estrès osmòtic i el salí (Soyka & Heyer, 1999; Hummel *et al.*, 2004; Alcázar *et al.*, 2006a; Alcázar *et al.*, 2006b).

Mitjançant tècniques de biologia molecular s'han obtingut plantes amb sobreexpressió del gen *ADC2*. Aquestes plantes presenten nanisme, retard en la floració degut a una deficiència de gibberel·lines, una disminució en la regulació de diferents gens, i una elevada acumulació de putrescina en comparació amb les plantes control. Aquesta gran quantitat de putrescina es va veure que corresponia a la fracció de putrescina conjugada (Alcázar *et al.*, 2006b). Com s'ha dit anteriorment, les poliamines es solen conjuguar amb àcids hidroxicinàmics formant les HCAA. Aquests tipus de compostos encara no han estat ben caracteritzats i identificats en la planta d'*Arabidopsis thaliana*, objectiu que es va pretendre amb el present treball, mitjançant tècniques de LC-MS/MS.

Per a la realització d'aquest estudi es varen utilitzar llavors d'*Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.), (varietat Columbia 0) obtingudes de la casa comercial Lehle seeds®

(<http://www.arabidopsis.com>). Les llavors de la mateixa varietat amb sobreexpressió del gen *ADC2* obtingudes per tècniques d'enginyeria genètica, van ser cedides pel Grup de Recerca de Poliamines de la Unitat de Fisiologia Vegetal del Departament de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia, de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

Les llavors dels dos tipus d'*Arabidopsis* (wt i amb sobreexpressió del gen *ADC2*) van sembrar-se en un substrat compost per una barreja de turba, perlita i vermiculita (2:1:1), en una cambra de cultiu a 22°C de temperatura i un 70% d'humitat, amb un fotoperíode de 8 hores de llum d'una intensitat de $190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, seguides de 16 de fosc. Tres setmanes després de la germinació, un grup de plantes wt va deixar de regar-se durant 3 setmanes. Aquest grup de plantes va correspondre a les mostres d'*Arabidopsis* amb estrès hídric (**AE**). L'altre grup wt que es va continuar regant va correspondre a les mostres control (**AC**). Les parts aèries dels tres grups de plantes (**ADC2**, **AE**, i **AC**) es van recol·lectar 6 setmanes després de la germinació, i es van congelar en nitrogen líquid immediatament. Les mostres van ser conservades a -80°C fins al moment de l'extracció.



Figura 2.3.- Imatge d'una planta d'*Arabidopsis thaliana*

2.1.4.- *Crinum humile* Herb., Amaryllidaceae

El gènere *Crinum* L. és l'únic gènere de la família de les Amaryllidaceae de caràcter pantropical, amb diferents espècies distribuïdes per Àfrica, Amèrica, Àsia i Austràlia. De fet, la bona adaptació de les seves llavors a la dispersió oceànica ha contribuït en gran mesura a la seva àmplia distribució (Meerow *et al.*, 2003). Actualment consta d'unes 180 espècies, de les quals 7 formen part de la flora del Camerun (*C. purpurascens*, *C. natans*, *C. jagus*, *C. glaucum*, *C. zeylanicum*, *C. distichum*, i *C. humile*) (Nordal, 1987).

Com la majoria de plantes de la família Amaryllidaceae, el gènere *Crinum* presenta un bulb, del qual surten unes fulles lineals. La seva inflorescència és en forma d'ombrel·la, i pot tenir d'1 a 15 flors grans. El fruit és una càpsula amb nombrosos grans. Aquest gènere, però, juntament amb els gèneres *Hippeastrum*, *Hymenocallis* i *Stenomesson*, presenta polimorfisme (Nordal, 1987; Meerow & Snijman, 1998; Meerow *et al.*, 2003).

A part de l'ús ornamental, les plantes de *Crinum* s'han utilitzat en preparacions per la pell i desordres intestinals, tot i que a altes dosis poden resultar molt tòxiques (Meerow & Snijman, 1998). Al Camerun, poden trobar-se diferents espècies de *Crinum* cultivades en jardins i prop de les cases (Nordal, 1987).

El *Crinum humile* és una planta herbàcia d'hàbitat tropical. Es localitza en la zona de l'Àfrica tropical, des de la Guinea fins a la República Centreafricana, principalment al Camerun. Viu en zones humides, en boscos prop de rius, o en les zones periòdicament inundades (Nordal, 1987; Snijman & Linder, 1996). Presenta uns bulbs de 3 a 4 cm de diàmetre. Les fulles apareixen al mateix temps que les flors o bé després, poden arribar a uns 30 cm de longitud, es disposen en forma de roseta basal, i tenen una tonalitat vermellosa en la base. Les flors són grosses (de 7.5 a 9 cm de llargada) i campanulades, de pètals blancs amb una línia dorsal de color rosa o porpra. L'aparença del *Crinum humile* és força semblant a la del *Crinum distichum*, fet que pot portar a confusió a l'hora de reconèixer-les (*Figura 2.4*). Ambdues espècies són poc conegudes (Nordal, 1987).

Tot i que les espècies de la família Amaryllidaceae han estat particularment estudiades pel seu contingut en alcaloides i les seves propietats farmacològiques, alguns flavonoides aïllats en aquesta família també han resultat tenir importants activitats citotòxiques i anticancerígenes (El Hafiz *et al.*, 1991; Min *et al.*, 2001). Així, la part de la recerca fitoquímica de l'espècie *Crinum humile* que es va centrar en la identificació de flavonoides, és la que s'inclou en el present treball de tesi.

Per l'estudi d'aquests metabòlits secundaris de *Crinum humile*, varen recol·lectar-se plantes senceres (fulles i bulbs) en època de prefloració, al juny de 2004, a la província de Dschang, a l'oest del Camerun.



Figura 2.4.- Il·lustració de *Crinum humile* (1), en comparació amb *Crinum distichum* (2). (Il·lustracions extretes de Nordal, 1987)

2.1.5.- *Pancratium canariense* Ker Gawler, Amaryllidaceae

El gènere *Pancratium* (Amaryllidaceae) comprèn prop de 20 espècies diferents, que es distribueixen per la zona costanera del Mediterrani, la zona subtropical de l'Àfrica Subsahariana i d'Àsia, i les Illes Canàries. Les espècies que formen aquest gènere són: *P. angustifolium*, *P. arabicum*, *P. biflorum*, *P. canariense*, *P. centrale*, *P. foeticum*, *P. illyricum*, *P. landesii*, *P. maritimum*, *P. maximum*, *P. parvum*, *P. saharae*, *P. sickenbergeri*, *P.*

tenuifolium, *P. tortuosum*, *P. triflorum*, *P. verecundum*, i *P. zeylanicum*. D'aquestes, el *P. maritimum* és l'espècie més coneguda i estudiada, ja que és la més freqüent a la zona del Mediterrani.

El *Pancratium canariense* és un endemisme de les Illes Canàries. Allà se la sol anomenar "Lágrimas de la Virgen", "Pancracia", o "Azucena de Risco", i se l'ha utilitzat principalment com a ornamental en els jardins de les cases, tot i que aquest ús s'està perdent a favor del cultiu de plantes ornamentals foranes.

Es tracta d'una planta perenne, de tija herbàcia i fulles lineals, que surten de bulbs d'uns 12-15 cm de diàmetre. Té una inflorescència en forma d'ombrel·la, d'entre 8 i 12 flors de pètals blancs i grans, i perfumades. El fruit és una càpsula amb llavors de color negre. Es sol localitzar en les vessants nord de les muntanyes, no exposades a sequera extrema o a temperatures massa elevades. Sol florir a principis de la tardor.

Per l'estudi del perfil alcaloïdic del *Pancratium canariense*, varen recol·lectar-se plantes senceres en època de postfloració, la primera setmana de desembre de 2006, a la zona del Barranco del Sao (Municipi d'Agaete), situat al nord-est de l'illa de Gran Canària.



Figura 2.5.- Imatge de *Pancratium canariense*

2.2.- Mètodes extractius

2.2.1.- Consideracions generals

Els processos extractius de metabòlits secundaris varien segons el tipus de mostra i el tipus de compostos que es desitja recuperar, és a dir, seran diferents segons s'utilitzi mostra fresca, congelada o bé dessecada, segons si els compostos d'interès són monomèrics o polimèrics, i segons la forma química en que es trobin en estat natural a la planta, és a dir, si estan lliures, en forma de sal, etc. Les extraccions es poden fer en aigua, en dissolvents orgànics de diferent polaritat, o bé en mesclades de diferents proporcions de dissolvents orgànics i aigua. S'acostuma a realitzar l'extracció a temperatura ambient, tot i que també es pot escalfar. (Tura & Robards, 2002).

Existeix un ampli ventall de processos extractius, que van des d'una extracció simple amb dissolvent o amb Soxhlet, fins a d'altres de més sofisticats com l'extracció de fluids en estat supercrític (SPE), o l'extracció assistida per microones (MAE). La introducció d'aquestes noves tècniques ha estat deguda a la demanda, cada vegada més gran, de nous mètodes extractius, més ràpids i automàtics, i que requereixin menys quantitat de dissolvents. Tot i així, els mètodes convencionals d'extracció encara dominen aquesta àrea. Els lípids i els pigments com les clorofil·les poden ser eliminats dels extractes, si és necessari, a través d'una partició amb cloroform o hexà. Els extractes poden ser analitzats directament o bé purificats mitjançant una nova extracció amb EtOAc, butanol o CHCl_3 abans de l'anàlisi, per tal d'obtenir un extracte uniforme, enriquit en els compostos d'interès, i lliure d'impureses (Tura & Robards, 2002; Robards, 2003; Naczka & Shahidi, 2006).

2.2.2.- Extracció de compostos fenòlics de lavandí

Una quantitat de 927 g del material vegetal, prèviament mòlt i dessecat, es va deixar macerar en MeOH durant 24 hores a temperatura ambient. El sobrenedant es va recollir i portar a sequedat a 40°C en pressió reduïda. Aquesta operació es va repetir 3 vegades, obtenint-se, finalment, 66.51 g d'extracte metanòlic sec (**E1**).

Per eliminar els greixos i clorofil·les, es va fer una partició amb hexà i H_2O . Després d'evaporar el dissolvent de la fracció orgànica en un rotavapor a 40°C, es van obtenir 3.44 g d'extracte d'hexà sec (**EHx**). La fracció aquosa es va filtrar, i posteriorment es va fer una altra partició amb EtOAc. El dissolvent orgànic de la fracció de EtOAc també es va evaporar en un rotavapor a 40°C obtenint 9.48 g d'extracte de EtOAc sec (**EAE**). La fracció aquosa es va liofilitzar, donant lloc, finalment, a 27.54 g d'extracte aquós sec (**EAg**).

Per portar a terme aquest procés d'extracció de compostos fenòlics es va seguir el protocol descrit per Parejo *et al.*, 2004a.

2.2.3.- Extracció de compostos fenòlics i derivats conjugats amb poliamines de tabac i d'*Arabidopsis thaliana*

Els compostos fenòlics i les poliamines tenen característiques químiques diferents que fan necessaris mètodes extractius específics. En el present treball de tesi es van assajar diferents mètodes publicats, a partir dels quals es van fer algunes modificacions. Van assajar-se diferents dissolvents i mesclades de dissolvents en diferents proporcions, i es va comprovar l'eficiència de l'extracció mitjançant anàlisis per HPLC-DAD i LC-MS/MS.

Extracció de compostos fenòlics de tabac

Per extreure els diferents derivats d'àcids hidroxicinàmics (glicòsids i HCAA) i de flavonoides era necessari un mètode adient pels diferents tipus de compostos a la vegada, que optimitzés al màxim la seva recuperació. Així, l'extracció es va fer en base als mètodes proposats per Keinänen *et al.*, 2001; Gális *et al.*, 2004; i Camacho-Cristóbal *et al.*, 2004. El mètode que va mostrar uns millors resultats i que, per tant, va ser l'escollit per fer les anàlisis qualitatives i quantitatives, va ser el següent:

1 g de material vegetal (FW) conservat a -80°C va ser triturat en N₂ líquid, i macerat immediatament amb 3.5 mL d'una barreja al 50% de MeOH i H₂O/HCOOH (97:3) durant 30 min en un bany d'ultrasons a temperatura ambient. Després d'una centrifugació a 12000 rpm durant 20 min, es va retirar el sobrenedant, i el dissolvent va ser evaporat al buit. El residu sec va dissoldre's en 2.5 mL d'una solució de HCOOH al 0.1% i, finalment, va filtrar-se en filtres de PTFE de 0.45 µm (Waters).

*Extracció de compostos fenòlics d'*Arabidopsis thaliana**

Per l'extracció dels mateixos compostos d'*Arabidopsis thaliana* es van assajar diferents mètodes i modificacions dels descrits per Li *et al.*, 1993; Burbullis *et al.*, 1996; Shenan, 1996; Hagemeyer *et al.*, 2001; i Von Roepenack-Lahaye *et al.*, 2004. Finalment, el mètode escollit va ser el mateix que es s'havia seguit en l'extracció de la planta de tabac, però amb la següent modificació: la maceració va fer-se en una solució de MeOH/HCOOH (97:3).

2.2.4.- Extracció de flavans de *Crinum humile*

El mètode d'extracció de flavans seguit en aquest treball va ser una modificació del proposat per Ramadan *et al.*, 2000. Així, 1.33 Kg de bulbs de *Crinum humile* secs es van triturar i deixar macerar en MeOH durant 48 hores. Aquest procés es va repetir dos cops més. El dissolvent de l'extracte metanòlic cru es va evaporar en un rotavapor. Amb el residu sec obtingut es va fer una partició amb CHCl_3 i H_2SO_4 al 2%. La fracció orgànica es va rentar amb H_2O destil·lada i es va concentrar sota pressió reduïda, fins a obtenir un residu viscos, del qual es van eliminar els greixos amb èter de petroli, obtenint, finalment, un residu sec de 5.46 g (**CHUS**).

2.2.5.- Extracció d'alcaloides de *Pancratium canariense*

Per l'extracció d'alcaloides es va seguir una modificació del mètode d'extracció descrit per Labraña *et al.*, 2002. Es va partir de 400 g de material vegetal fresc (bulb, tiges i fulles), que es van triturar i deixar macerar en MeOH durant 48 hores, procés que es va repetir dos cops més. El dissolvent de l'extracte metanòlic cru es va evaporar a pressió reduïda. El residu sec obtingut es va dissoldre en H_2O , i va acidificar-se amb H_2SO_4 al 5% fins a pH 3-4. Posteriorment es va extreure el material neutre amb Et_2O . La fase aquosa àcida resultant va ser basificada amb NH_4OH al 20% fins a pH 10-11, i es va extreure amb EtOAc i EtOAc/MeOH (3:2) repetides vegades. Els dissolvents es van anar evaporant al rotavapor fins a obtenir un extracte alcaloïdic sec de 3.84 g (**AAA1**) en l'extracció amb EtOAc, i de 0.19 g en l'extracció amb EtOAc/MeOH (3:2) (**AAA2**).

2.3.- Fraccionament i purificació dels extractes de lavandí, *Crinum humile* i *Pancratium canariense*

2.3.1.- Cromatografia de líquids al buit

L'extracte **CHUS** de *Crinum humile* es va fraccionar segons una modificació del mètode descrit per Ramadan *et al.*, 2000, a través d'una cromatografia de líquids al buit, amb silicagel 60 A C.C de 6-35 mm de granulometria (SDS) com a fase estacionària. Com a eluent es va utilitzar èter de petroli, i es va anar augmentant la polaritat amb una proporció creixent de EtOAc fins arribar a un 100% de EtOAc. D'aquest fraccionament es van poder aïllar dos compostos, **CHU1** i **CHU2**.

Pel fraccionament de l'extracte alcaloïdic de *Pancreatium canariense* (**EAA1** i **EAA2**), es va portar a terme una cromatografia de líquids al buit segons el mètode descrit per Labraña *et al.*, 2002, utilitzant silicagel 60 A C.C de 6-35 mm de granulometria (SDS) com a fase estacionària, i una mescla de diferents dissolvents de polaritat creixent com a fase mòbil. Es va començar amb hexà al 100%. Posteriorment es va seguir amb mescles d'hexà amb creixent proporció de EtOAc fins arribar a un 100% de EtOAc, i finalment amb mescles de EtOAc amb creixent proporció de MeOH, fins arribar a EtOAc /MeOH 80:20.

2.3.2.- Cromatografia de gel-filtració

Per la purificació de l'extracte sec **EAE** de lavandí es va utilitzar una columna cromatogràfica de tipus gel-filtració, amb Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia) com a fase estacionària, i MeOH com a fase mòbil (Parejo *et al.*, 2004a; Nacz & Shahidi, 2006). Aquest tipus de cromatografia es basa en la separació selectiva de les molècules de solut per exclusió de grandària, és a dir, les molècules més petites entren dins els porus de les partícules de la fase estacionària i queden més retingudes, tardant més temps a ser eluïdes. Les molècules més grans, en canvi, no entren dins els porus de les partícules i baixen directament. Així, a diferència de la sílice, no es dona una adsorció de les molècules de solut en la fase estacionària, sinó que es dona una exclusió de les molècules de grandària superior a un determinat diàmetre de porus. Aquest tipus de cromatografia líquida permet una elevada recuperació del solut i, tot i que presenta una resolució relativament baixa, resulta ràpida, senzilla i compatible amb un ampli rang de fases mòbils (Hostettmann *et al.*, 2001).

2.3.3.- Monitorització per cromatografia en capa fina (TLC)

El seguiment de la purificació dels compostos amb cromatografies de líquids al buit i de gel-filtració es va fer mitjançant una cromatografia en capa fina (TLC) de silicagel 60 (Machery-Nagel, Alugram[®] SIL G/UV 254), amb indicador de fluorescència sota llum ultraviolada. Com a fase mòbil es va utilitzar una mescla de EtOAc/H₂O/HOAc (10:3:2) pels compostos fenòlics, i una mescla de MeOH i EtOAc (1:9) pels alcaloides. Per una millor visualització es van utilitzar diferents solucions reveladores específiques per cada tipus de compost. Així, pels compostos fenòlics es va utilitzar una solució d'àcid difenilbòric a l'1% p/v en MeOH, que tenyeix aquests compostos d'un color groc-ataronjat, visible, també, sota la llum UV a λ de 254 i 365 nm. Concretament pels flavans, va utilitzar-se un indicador de FeCl₃, que fa que els compostos fenòlics adquireixin un color blau-verdós sota llum UV a una λ de 254 nm. Pels alcaloides es va utilitzar el reactiu de Dragendorff, que tenyeix els compostos nitrogenats de color vermell-ataronjat. Amb aquest seguiment es va poder

realitzar correctament el fraccionament i la purificació dels extractes (Ramadan *et al.*, 2000; Labraña *et al.*, 2002; Parejo *et al.*, 2004a).

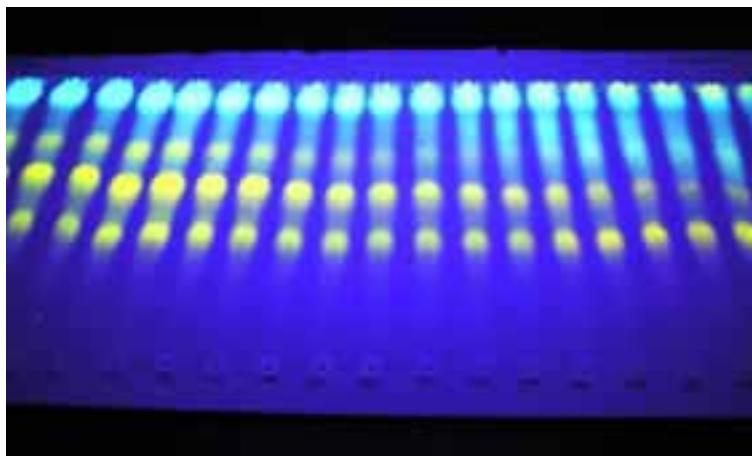


Figura 2.6.- Visualització d'una TLC sota llum UV de compostos fenòlics del lavandí

2.4.- Tècniques d'identificació de compostos

La identificació de productes naturals com ara els polifenols o els alcaloides ha estat útil en camps de la ciència molt diversos. Històricament ha servit per identificar plantes en base a la quimiotaxonomia, i com a empremta dactilar per a la autenticació de vins, olis i altres productes comercials (Revilla *et al.*, 2001; Tura & Robards, 2002). Paral·lelament, s'han descobert i identificat nous compostos, dels quals s'han estudiat les seves propietats biològiques i/o farmacològiques. A més, la gran disponibilitat d'assaigs *in vitro* per a les activitats d'aquests compostos, ha permès fer un extens *screening* de nombrosos productes naturals. Això ha portat al descobriment de noves molècules amb propietats farmacològiques i de relacions d'estructura-activitat que han proporcionat les bases pel disseny de nous fàrmacs.

2.4.1.- Cromatografia de líquids d'alta resolució acoblada a DAD (HPLC-DAD)

En l'actualitat, la cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC) s'ha convertit en la tècnica més popular i fiable de separació de compostos fenòlics, motiu pel qual s'utilitza de manera rutinària en l'estudi fitoquímic de plantes i/o extractes vegetals.

S'han estudiat diferents sistemes per a la separació i identificació de polifenols. El que s'ha trobat més útil per aquest tipus de compostos consisteix en una cromatografia de líquids en fase invertida (RPLC), amb una columna de fase estacionària C₁₈. El gradient en una RPLC comença amb un elevat percentatge del component aquós i, de mica en mica, s'augmenta la proporció del component orgànic (ACN o MeOH), de manera que els compostos fenòlics més polars són els primers a ser eluïts. Amb aquestes condicions, l'ordre d'elució dels compostos fenòlics és el següent: àcids benzoics - àcids cinàmics - flavonoides. Dins els flavonoides que tenen el mateix patró de substitució, primer elueixen els glicòsids de flavanones, seguits dels de flavonols i flavones. Finalment, elueixen les aglicones lliures en el mateix ordre (Shahrzad & Bitsch, 1996).

Existeixen diferents tipus de detectors, alguns d'ells universals per tot tipus de molècules, i d'altres, en canvi, específics per determinats compostos. Els detectors de fluorescència s'han utilitzat, per exemple, en la detecció i identificació de poliamines, prèvia derivatització per addició d'un grup amb emissió fluorescent com el dansil (Marcé *et al.*, 1995). D'altra banda, els de UV es basen en la capacitat dels compostos d'absorbir aquest tipus de llum, i poden ser de longitud d'ona fixa o de longituds d'ona variable. Aquests darrers, anomenats detectors en sèrie de diodes (DAD), proporcionen una informació addicional molt útil en la identificació de la molècula, ja que mostren la corba d'absorció UV característica de cada compost i, a través de la comparació amb la de compostos estàndard, faciliten la seva identificació. Compostos fenòlics com àcids benzoics, àcids hidroxicinàmics i flavonoides han estat tradicionalment analitzats per aquesta tècnica gràcies als dobles enllaços carboni-carboni conjugats que contenen, que fan possible l'absorció de llum de longituds d'ona corresponents a la zona de UV. Normalment s'analitzen a 280 nm, tot i que també es solen emprar algunes λ més específiques per determinats tipus de compostos com ara els 360 nm pels àcids hidroxicinàmics o els 530 nm per les antocianines. La sensibilitat dels detectors de UV pot resultar adequada per la determinació de compostos que formen part d'un extracte, i també per fer estudis farmacocinètics en pacients. Tot i així, en alguns casos aquesta sensibilitat no és suficient i es requereixen tècniques més potents, com ara l'espectrometria de masses (Waksmundzka-Hajnos, 1998; Robards, 2003).

2.4.2.- Espectrometria de masses (MS)

La MS és una eina amb un gran potencial per l'elucidació i identificació de compostos. Aquesta tècnica és capaç de proporcionar molta informació: massa molecular dels compostos, estructura de l'aglicona, punts de substitució de la molècula, patrons de glicosilació, metilació o sulfuració, tipus de sucres, etc. A més, permet fer aquests tipus d'estudis amb molt poca quantitat de mostra (Stobiecki, 2000).

La MS també s'ha portat a terme *on-line*, acoblada a tècniques de separació com cromatografies de líquids, de gasos o electroforesis. Aquest fet encara la converteix en una tècnica més potent per a la identificació de compostos, ja que combina la informació estructural que proporciona la MS amb la capacitat de separació de la HPLC (Robards, 2003). Cal tenir en compte, però, que la HPLC i la MS no requeriran les mateixes condicions de treball. Així, mentre que per la HPLC és necessària l'aplicació, a temperatura ambient, d'un flux i pressió elevats, per la MS es requereix una alta temperatura i un flux i pressió baixos, arribant al buit (He, 2000).

El fonament d'aquesta tècnica consisteix en la ionització de la molècula, que fa que aquesta pugui ser detectable d'acord amb la seva relació massa/càrrega (m/z). Els dos punts claus d'aquesta tècnica són la font de ionització i l'analitzador.

Fonts d'ionització

Existeixen diferents sistemes de ionització com l'impacte electrònic (EI), la ionització química (CI), l'electrosprai (ESI), o la ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) (He, 2000; Stobiecki, 2000). El sistema de EI consisteix en la ionització de les molècules d'analit a través de l'impacte amb electrons altament energètics, que han estat accelerats per una diferència de voltatge de 50-70 eV. Aquesta ionització provoca una fragmentació de la molècula molt energètica, però permet la determinació de la seva estructura. En la CI els analits s'ionitzen per la reacció amb ions de molècules de gasos de massa molecular relativament petita com el metà (com a CH_5^+), l'isobutà (com a $(\text{CH}_3)_3\text{C}^+$) o l'amoni (NH_4^+). Aquest tipus de ionització aporta menys energia a la molècula analit, de manera que els ions formats es fragmenten menys que en el EI. Per això, la CI proporciona menys informació per determinar l'estructura de la molècula, però a canvi, pot proporcionar la massa molecular del compost, ja que aquesta, a vegades, pot quedar totalment fragmentada per el EI i no ser visible. Tant en el EI com en la CI els ions entren directament en fase gasosa al detector, fet que permet l'acoblament amb la cromatografia de gasos (GC-MS). El sistema de ESI, en canvi, permet l'acoblament amb la cromatografia de líquids, ja que es crea un aerosol de la mostra líquida. Aquest aerosol es sotmet a un alt voltatge en una cambra de pressió propera a l'atmosfèrica per aconseguir la ionització i, paral·lelament, es tracta amb un gas assecant per tal d'evaporar el solvent de les gotes d'aerosol amb l'analit ionitzat. Finalment els ions entren en el detector en fase gasosa. El ESI va suposar un gran avenç en l'anàlisi de compostos per MS, ja que l'acoblament amb la cromatografia de líquids va proporcionar una millora en la sensibilitat, potència i resolució de les anàlisis de compostos no volàtils sense la necessitat de derivatitzar-los (Smith *et al.*, 1990, Abian, 1999). Com el ESI, el APCI també permet l'acoblament de la cromatografia de líquids amb l'espectrometria de masses, ja que també s'evapora la fase mòbil a pressió semblant a l'atmosfèrica, en

aquest cas mitjançant una font de calor a temperatures superiors a 500°C. La ionització es realitza per la transferència de càrrega de molècules ionitzades de la fase mòbil als analits a través de reaccions químiques. Aquesta tècnica, però, no és aplicable a molècules d'alt pes molecular (superior a 1500 unitats de massa atòmica) i/o termolàbils i, a diferència del ESI (que permet l'anàlisi de tot tipus de molècules, especialment les de polaritat mitjana-alta), és utilitzat principalment per l'anàlisi de molècules de polaritat mitjana-baixa (Rosenberg, 2003; Smith, 2004).

Analitzadors de masses

També existeixen diferents tipus d'analitzadors de masses. Els més utilitzats són els de temps de volada (TOF) i els de transmissió de quadrupol (Q). L'analitzador TOF es basa en el principi que diferents ions als quals se'ls aplica la mateixa energia inicial, tindran velocitats proporcionals al seus valors de m/z . Els ions, un cop surten de la font d'ionització, són accelerats a través d'un tub de volada gràcies a l'aplicació d'un potencial elèctric. L'espectre de masses s'aconsegueix a través del senyal que rep el detector en funció del temps que arriba cada ió, i és convertit en m/z per un sistema de conversió de dades. D'altra banda, els quadrupols (Q) són, potser, els analitzadors més utilitzats en laboratoris d'anàlisi orgànica. Un quadrupol està constituït per quatre varetes paral·leles a les quals se'ls aplica un voltatge i una ràdiofreqüència. Quan les molècules ionitzades entren al quadrupol, comencen a oscil·lar a causa d'aquest voltatge. En un determinat voltatge, només les molècules que oscil·len a la freqüència correcta podran passar a través del quadrupol i arribar al detector.

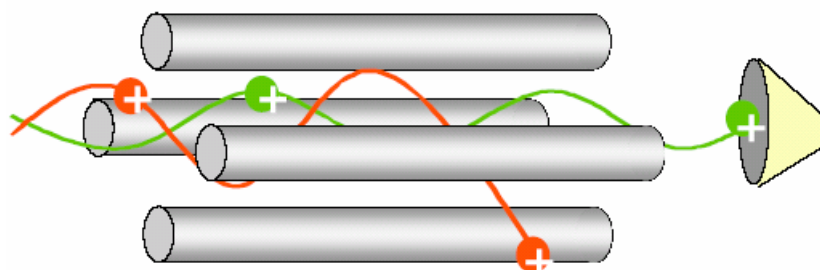


Figura 2.7.- Esquema d'un quadrupol, format per les quatre varetes paral·leles. Els ions verds vibren a la freqüència correcta, de manera que són transmesos al llarg del quadrupol i arriben al detector. Els ions taronges, en canvi, no vibren a la freqüència especificada, i surten fora del quadrupol abans d'arribar al detector.

Experiments de masses en tàndem (MS/MS)

Les tècniques de ionització a pressió atmosfèrica comentades són relativament suaus, i generen principalment molècules protonades $[M + H]^+$ o desprotonades $[M - H]^-$, o bé ions que representen pèrdues moleculars simples com la pèrdua d'aigua $[M + H - H_2O]^+$. La informació de la massa molecular del compost resulta molt útil, però no permet determinar l'estructura de la molècula. Per obtenir aquest tipus d'informació és necessària la fragmentació de l'espècie ionitzada. Aquesta operació es realitza en una cel·la de col·lisió, a través de l'impacte amb un gas inert. Aquest fenomen és conegut amb el nom de dissociació induïda per col·lisió (CID). En un aparell que disposi de triple quadrupol o bé quadrupol/quadrupol/temps de volada com a analitzadors, la dissociació es porta a terme en el segon quadrupol, mentre que al tercer quadrupol o al TOF es genera l'espectre dels ions resultants. El primer quadrupol pot restar estàtic o ser un seleccionador d'ions segons el tipus d'experiment que es realitzi.

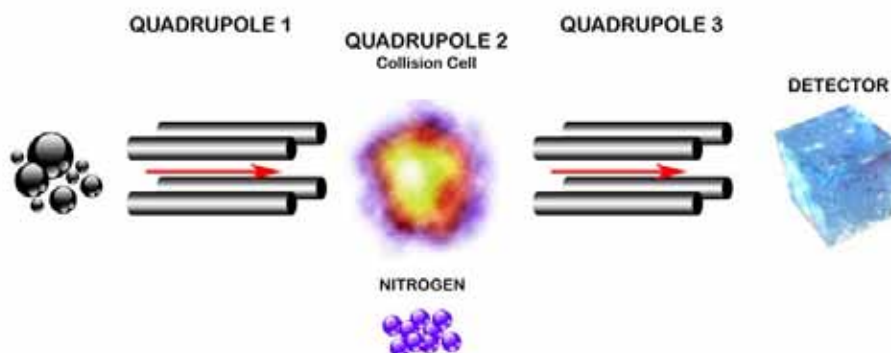


Figura 2.8.- Esquema d'un triple quadrupol, amb el quadrupol 2 com a cel·la de col·lisió, on es fragmenten les molècules d'analit per l'impacte amb àtoms de nitrogen gas

En el cas del triple quadrupol es poden realitzar els següents tipus d'experiments:

Full scan

En aquest experiment no es realitza fragmentació dels ions. Es fixa un rang de m/z i s'analitzen tots els compostos de m/z compresa en aquest rang. S'obté un cromatograma amb tots els pics, a més de l'espectre de masses de cada pic. Aquest experiment pot realitzar-se amb el Q1 o el Q3, ja que només és necessari un quadrupol.

Product ion scan (PIS)

En aquest experiment es fixa el Q1 a una determinada m/z , de manera que només van a la cel·la de col·lisió (Q2) els ions d'aquella m/z fixada. Aquests ions impacten amb els àtoms de nitrogen i passen al Q3, que analitza les seves m/z . Aleshores s'obté l'espectre de masses dels fragments dels ions que s'han seleccionat en el Q1.

Precursor ion scan (Prec)

En aquest experiment es fixa el Q3 a una determinada m/z , i s'analitza en el Q1. Així doncs només s'analitzaran aquells ions precursors que tenen per fragments producte els ions fixats en el Q3. S'obté l'espectre de masses d'aquelles molècules que es trenquen donant lloc a un fragment d'aquella m/z fixada.

Neutral loss scan (NL)

Aquí s'escaneja simultàniament en el Q1 i en el Q3, amb una determinada diferència de massa, de manera que es detecten tots els ions que tinguin una pèrdua d'aquella massa específica. S'utilitza molt per fer *screening* de grups de compostos que donen lloc a la mateixa pèrdua. Per exemple, una hexosa (glucosa o galactosa) suposa una pèrdua d'una massa de 162, un àcid glucurònid de 176, una ramnosa de 146 i una rutinosa de 308.

Multiple reaction monitoring (MRM)

En aquest cas tant el Q1 com el Q3 actuen com a seleccionadors (Q1 selecciona un ió precursor i Q3 selecciona un ió producte del precursor seleccionat a Q1). Aquest experiment és altament selectiu, de manera que és l'utilitzat en la quantificació dels analits. D'altra banda, però, no proporciona informació espectral.

Experiment	Q1	Q3
<i>Product ion scan</i>	Estàtic, selecciona el precursor	Escaneja
<i>Precursor ion scan</i>	Escaneja	Estàtic, selecciona l'ió producte
<i>Neutral loss scan</i>	Escaneja, sincronitzat amb Q3	Escaneja, sincronitzat amb Q1
MRM	Estàtic, selecciona el precursor	Estàtic, selecciona l'ió producte

Taula 2.1.- Experiments de MS/MS que es poden realitzar en múltiples etapes

En el present treball experimental es van utilitzar diferents aparells i sistemes de LC-MS/MS, LC-MS-TOF i GC-MS.

2.4.2.1.- Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS)

Per l'anàlisi dels alcaloides de les Amaryllidaceae dels extarctes **AAA1** i **AAA2** de *Pancreatium canariense* es va utilitzar un cromatògraf de gasos 6890 N, acoblat a un espectròmetre de masses 5975 inert XL (ambdós d'Agilent Technologies).

La columna utilitzada va ser una HP-5 (30 m x 0.25 µm x 0.25 mm) (Agilent Technologies). La rampa de temperatura aplicada va ser la següent: 2 minuts a la temperatura inicial de 100 °C, amb un increment de 15°C/min fins a 180°C, 1 min a 180°C, un increment de 5°C/min fins a la temperatura final de 300°C, i 1 min a aquesta temperatura final. Les temperatures de la font, injector i detector van ser de 230, 250, i 280°C respectivament. La ionització dels compostos es va portar a terme mitjançant EI.

Les mostres es van preparar extemporàniament a una concentració de 30 mg/mL en MeOH.

Els alcaloides de les Amaryllidaceae purs utilitzats com a estàndards per a la identificació d'alcaloides en *Pancreatium canariense* van ser proporcionats pel Grup de Recerca de Fitoquímica de la Unitat de Fisiologia Vegetal del Departament de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia, de la Facultat de Farmàcia (Universitat de Barcelona), aïllats prèviament de diferents espècies de la família de les Amaryllidaceae, i identificats per tècniques de NMR.

2.4.2.2.- Cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS)

En l'anàlisi dels compostos fenòlics es van portar a terme experiments de LC-ESI-MS/MS.

Per la cromatografia de líquids es va utilitzar un aparell HPLC Perkin-Elmer Serie 200, equipat amb un detector UV de λ fixa, i amb una columna Luna C18 (Phenomenex) de 150 x 2.1 mm, i 5 μ m de mida de partícula.



Figura 2.9.- Imatge dels aparells HPLC i MS acoblats utilitzats en aquest treball

Per la separació dels compostos fenòlics del lavandí es va utilitzar una fase mòbil A (H₂O 0.05% HOAc) amb creixent proporció de fase mòbil B (ACN 0.05% HOAc), amb el següent gradient d'elució:

Temps (min)	A (%) (H₂O 0.05% HOAc)	B (%) (ACN 0.05% HOAc)
0	95	5
10	85	15
30	65	35
40	20	80
45	95	5

Taula 2.2.- Gradient d'elució utilitzat en la separació de compostos fenòlics del lavandí

Les mostres es van preparar dissolent 500 µg d'extracte sec en 1,5 mL de fase mòbil A, filtrant, després, a través de filtres de PTFE de 0.45 µm (Waters). El volum d'injecció va ser de 25 µL, i el flux de 0.4 mL/min. Els compostos es van analitzar a una λ de 280 nm.

Per la identificació dels compostos fenòlics del lavandí es van portar a terme experiments de *Full scan*, PIS, Prec i NL.

Per la separació dels compostos fenòlics del tabac i d'*Arabidopsis thaliana*, es va utilitzar la mateixa fase mòbil A, i MeOH amb 0.05% de HOAc com a fase mòbil B. El gradient d'elució va ser el següent:

Temps (min)	A (%) (H₂O 0.05% HOAc)	B (%) (MeOH 0.05% HOAc)
0	100	0
25	66	34
30	46	54
35	20	80
37	0	100
40	0	100
43	100	0
50	100	0

Taula 2.3.- Gradient d'elució utilitzat en la separació de compostos fenòlics del tabac i de l'*Arabidopsis thaliana*

El volum d'injecció també va ser de 25 µL, i el flux de 0.4 mL/min. Els compostos es van analitzar a una λ de 280 nm.

Per la identificació dels compostos, es van portar a terme experiments de *Full scan*, PIS, Prec, NL, i MRM.

L'espectròmetre de masses acoblat a HPLC va ser un triple quadrupol API 3000 d'Applied Biosystems (Sciex). Les anàlisis es van portar a terme utilitzant una font de ESI *Turbo Ionspray*, en mode negatiu en el cas dels compostos fenòlics, i en mode positiu en el cas dels derivats de poliamines. Els paràmetres instrumentals s'indiquen a la *Taula 2.4*.

Paràmetre	Valor
Voltatge capil·lar	3500 V / -3500 V (segons el mode positiu o negatiu)
Gas nebulitzador (N ₂)	10 (unitats arbitràries)
Gas cortina (N ₂)	12 (unitats arbitràries)
Gas de col·lisió (N ₂)	4 (unitats arbitràries)
Potencial del focus	-200 V
Potencial d'entrada	10 V
DP (<i>declustering potential</i>)	60, 40, 30 V / -60, -40, -30 V (segons la molècula i el mode positiu o negatiu)
CE (energia de col·lisió)	20, 30, 40 V / -20, -30, -40 V (segons la molècula i el mode positiu o negatiu)
Gas auxiliar (N ₂)	Escalfat a 400 °C i introduït a un flux de 8000 cm ³ /min

Taula 2.4.- Paràmetres instrumentals emprats pels experiments de MS i MS/MS

En el *Full scan* es va analitzar un rang de m/z entre 80 i 1000, en un cicle de temps de 2 segons. Els experiments MS/MS es van portar a terme mitjançant el sistema CID.

Els compostos estàndard utilitzats per la identificació de compostos fenòlics van ser obtinguts de Fluka[®] (luteolina, àcid cafeic i àcid ferúlic), de Sigma[®] (kaempferol, rutina, àcid clorogènic i àcid cumàric) i d'Extrasynthese[®] (àcid rosmarínic, apigenina i quercetina-3-*O*-glucòsid).

Els compostos purs derivats de putrescina (cafeoïlputrescina, cumaroïlputrescina i feruloïlputrescina) i el derivat d'espermidina (*N*⁸-feruloïlespermidina) van ser cedits pel Dr. Jonathan Negrel de la UMR Plante-Microbe-Environnement, INRA (Université de Bourgogne, França).

2.4.2.3.- Cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses amb detector TOF (LC-MS-TOF)

L'aparell de MS-TOF utilitzat va ser un Mariner Biospectrometry, també acoblat a HPLC. Es va utilitzar la mateixa columna cromatogràfica, flux, volum d'injecció i gradient d'elució que en les anàlisis de LC-MS/MS. El calibratge extern es va fer amb NaI, i l'intern amb daidzeïna, que té una m/z $[M - H]^-$ isotòpica de 253.05009.

Aquest aparell permet el càlcul de la massa exacta de l'analit amb una precisió fins a tres decimals, però no permet fer experiments de MS/MS.

2.4.3.- Ressonància magnètica nuclear (NMR)

Quan les dades obtingudes en l'espectre de masses són insuficients per establir l'estructura definitiva d'una molècula, la NMR resulta una eina molt útil per a l'elucidació estructural. Cal tenir en compte, però, que els espectres de NMR dels compostos fenòlics i alcaloides són freqüentment complexos, i la identificació dels compostos aïllats resulta complicada. Així, l'espectroscòpia de NMR bidimensional (2D NMR) completa la informació proporcionada per la monodimensional. La sensibilitat limitada i la necessitat d'aïllar quantitats de mostra relativament grans, són habitualment les principals limitacions de l'espectroscòpia de NMR. Per a la completa elucidació estructural d'un nou compost és necessari portar a terme anàlisis de $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ i DEPT, a més d'experiments de correlacions bidimensionals: $^1\text{H-}^1\text{H}$ (COSY), i $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ (HSQC i HMBC).

Per l'elucidació estructural dels compostos **CHU1** i **CHU2**, aïllats de *Crinum humile*, es varen utilitzar els aparells Gemini 300 i Mercury 400 (Varian). Van realitzar-se experiments de $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ i DEPT, i correlacions bidimensionals de $^1\text{H-}^1\text{H}$ (COSY), i $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ (HSQC i HMBC). Les mostres es van preparar a una concentració de 5 mg/mL en CDCl_3 .

2.4.4.- Espectroscòpia d'infraroig (IR)

L'espectroscòpia d'infraroig és una eina molt fiable en el camp de la identificació de molècules, ja que l'espectre d'absorció en la regió del IR depèn de la vibració dels enllaços que constitueixen l'estructura molecular, i és diferent i característic de cada molècula, ja que és possible relacionar certes bandes d'absorció de IR amb la presència de determinats enllaços o grups funcionals en la molècula. A part de la seva àmplia utilització en el camp del control de qualitat, l'espectroscòpia de IR té un gran interès en el camp de la investigació, ja que, conjuntament amb altres tècniques espectroscòpiques, permet l'assignació d'estructures de noves molècules (Valls, 1998).

Els espectres de IR dels compostos **CHU1** i **CHU2** aïllats del *Crinum humile* van realitzar-se en un espectrofotòmetre Perquin-Elmer 1430, utilitzant pastilles de NaCl d'1cm d'espessor.

2.4.5.- Dicroïsmes circulars (CD)

L'anàlisi del dicroïsmes circulars és una potent eina per establir la configuració absoluta de molècules amb centres quirals com flavonoides o alcaloides. Es basa en el principi que la llum circularment polaritzada (definida com a suma de dos components esquerre i dret, en fase, i de la mateixa amplitud), en entrar en contacte amb un medi òpticament actiu el qual absorbeix un rang de longituds d'ona que conté el de la llum polaritzada, el pla de polarització de la llum rota en un angle α , ja que el medi absorbeix la llum polaritzada esquerra i dreta de manera diferent, fent que la llum resultant sigui el·lípticament polaritzada. Aquesta diferència d'absorció és el senyal que s'anomena dicroïsmes circulars (Berova *et al.*, 2000; Slade *et al.*, 2005).

Les anàlisis de CD que es van portar a terme en el present treball es varen realitzar en un espectropolarímetre Jasco J-810. La concentració en que està preparada la mostra a analitzar és un factor important en la resolució de l'anàlisi. En aquest cas, les mostres van ser preparades a una concentració d'1mg/mL en MeOH.

2.5.- Quantificació de compostos fenòlics

Fins fa poc l'interès en la quantificació dels compostos fenòlics era relativament menor que en la seva caracterització, ja que el ventall de compostos fenòlics de referència disponibles comercialment era molt baix. Actualment, però, aquesta tendència està canviant ràpidament. S'ha vist, per exemple, que les concentracions de polifenols varien molt d'unes plantes a les altres, fet que fa necessària una quantificació per tal de poder fer estudis comparatius entre diferents espècies, diferents situacions ambientals i/o fisiològiques, sobre la localització dels compostos en les diferents parts de la planta, etc. A més, el problema de la disponibilitat comercial de compostos de referència s'està resolent a mesura que se'n van identificant i sintetitzant de nous (Escarpa & González, 2001).

2.5.1.- Quantificació dels àcids rosmarínic i clorogènic en el lavandí

La quantificació dels àcids rosmarínic i clorogènic es va fer mitjançant una corba de calibratge per HPLC-DAD, amb estàndards comercials dels corresponents compostos, obtinguts d'Extrasynthese® (àcid rosmarínic) i de Sigma® (àcid clorogènic). L'aparell HPLC utilitzat, així com la columna cromatogràfica, el gradient de solvents, i el volum d'injecció, van ser els mateixos aplicats en l'anàlisi qualitativa del lavandí per LC-MS/MS, descrits en l'apartat 2.4.2.2.

Els compostos estàndard es van dissoldre en MeOH i es van preparar diferents concentracions (150, 100, 75, 50, 25 i 10 µg/mL). Cada concentració es va assajar per duplicat, i de cada duplicat es van realitzar dues injeccions.

El material vegetal es va preparar de la següent manera: una quantitat de 250 mg (DW) de material de rebuig del lavandí polvoritzat es va macerar en 25 mL d'una solució MeOH/H₂O al 50% en un bany d'ultrasons durant 30 minuts. Després de 10 min de centrifugació a 14000g es va recollir el sobrenedant i es va ajustar el volum a 25 mL. Immediatament, es va analitzar per HPLC-DAD. Van analitzar-se un total de 10 extraccions, de les quals es va calcular la desviació estàndard.

2.5.2.- Quantificació de derivats de compostos fenòlics en el tabac

2.5.2.1.- Quantificació relativa per normalització interna per LC-MS/MS

El mètode de quantificació per normalització interna es basa en el principi que el senyal analític de cada solut és proporcional, amb un marge de linealitat, al d'un determinat solut (estàndard intern) afegit a la mostra a una determinada concentració. Aquest mètode presenta una sèrie d'avantatges com ara que es requereixen poques injeccions. D'aquesta manera es limiten els possibles errors produïts per la pesada, manipulació i injecció de nombroses mostres (Vial *et al.*, 2001).

Tot i que no es tracta d'un mètode de quantificació exacte, resulta útil per comparar l'abundància relativa dels metabòlits i el seu augment o disminució en diferents situacions, com ara la senescència i l'estrès hídric en les plantes de tabac.

En el present treball es va realitzar una quantificació per normalització interna dels derivats de compostos fenòlics en plantes de tabac mitjançant el mètode de MRM de LC-MS/MS.

El compost utilitzat com a estàndard intern va ser la taxifolina (dihidroquercetina) (Sigma[®]), de Mw de 304, que va ser afegit a les mostres de manera que la concentració final en el vial d'anàlisi fos de 5 µg/mL. L'aparell LC-MS/MS va ser el mateix utilitzat en l'anàlisi qualitativa, així com la columna cromatogràfica, el gradient de solvents i les condicions d'anàlisi (descrits en l'*apartat 2.4.2.2*). El volum d'injecció va ser de 10 µL, i l'anàlisi es va portar a terme en mode negatiu. Les DP i CE aplicades a cada compost van ser les òptimes per a cadascun, determinades prèviament mitjançant una anàlisi de PIS dels compostos a diferents DP i CE. Els dos fragments escollits per la monitorització en MRM van

ser la m/z de l'ió precursor i la m/z de l'ió producte que apareix amb més intensitat en les anàlisis de PIS, que es resumeixen a la *Taula 2.5*.

Compost	Fragments MRM (m/z)	DP	CE
Taxifolina	303/285	-50	-20
Àcids cafeoilquínics	353/191	-50	-20
Àcids cumaroilquínics	337/191	-50	-20
Àcids feruloilquínics	367/191	-50	-20
Glucòsids d'àcid cafeic	341/179	-60	-30
Glucòsid d'àcid cumàric	325/163	-50	-20
Glucòsid d'àcid ferúlic	355/193	-60	-30
Glucòsid d'àcid salicílic	299/137	-30	-30
Glucòsids d'àcid sinàpic	385/223	-50	-20
Glucòsid d'àcid trihidroxicinàmic	357/195	-50	-20
Kaempferol-7- <i>O</i> -neohesperidòsid	593/285	-60	-40
Rutina	609/301	-60	-40

Taula 2.5.- Transicions de MRM, DP i CE dels derivats de compostos fenòlics quantificats per normalització interna en el tabac

2.5.2.2.- Quantificació de l'àcid neoclorogènic i la rutina per HPLC-DAD mitjançant una corba de calibratge

Per l'especial rellevància, en termes de concentració, dels compostos rutina i àcid neoclorogènic respecte la resta de derivats fenòlics presents en el tabac, es va realitzar una quantificació més acurada d'aquests compostos. Aquesta quantificació es va portar a terme mitjançant la realització d'una corba de calibratge per HPLC-DAD amb compostos estàndard de rutina i àcid clorogènic (Sigma[®]), dels quals varen preparar-se dissolucions en MeOH a diferents concentracions (100, 50, 25, 10 i 5 µg/mL). Cada concentració es va assajar per duplicat, i de cada duplicat es varen realitzar dues injeccions.

El procés d'extracció dels compostos va ser el mateix descrit en l'*apartat 2.2.3*. Varen analitzar-se mostres de 10 extraccions, de les quals es va calcular la desviació estàndard.

2.5.2.3.- Quantificació de conjugats de putrescina amb àcids hidroxicinàmics per LC-MS/MS mitjançant una corba de calibratge

Degut a la baixa concentració que presenten aquests compostos en les fulles de tabac, no eren detectables a través de HPLC-DAD, de manera que va ser necessària la utilització de la tècnica de LC-MS/MS en mode MRM, el mode més sensible, per a la seva quantificació.

Varen realitzar-se tres corbes de calibratge amb compostos purs de cafeoïlputrescina, cumaroïlputrescina i feruloïlputrescina. Aquests compostos es van dissoldre en una solució de HOAc al 0.05% i es van preparar diferents concentracions, 0.05, 0.25, 0.5, 1, i 2 µg/mL pels compostos feruloïlputrescina i cumaroïlputrescina, i 0.01, 0.05, 0.25, 0.5, 1, i 2 µg/mL en el cas de la cafeoïlputrescina.

El procés d'extracció dels compostos també va ser el mateix descrit en l'*apartat 2.2.3*, i varen analitzar-se mostres de 10 extraccions, de les quals es va calcular la desviació estàndard.

Els instruments de LC-MS/MS i les condicions d'anàlisi va ser els mateixos emprats en l'anàlisi qualitativa (*apartat 2.4.2.2*), amb la diferència que el volum d'injecció va ser de 10 µL, i que es van portar a terme amb el mètode de MRM, en mode positiu. Les DP i CE aplicades a cada compost van ser les òptimes, determinades prèviament amb experiments de PIS dels compostos purs. Els dos fragments escollits per la monitorització en MRM van ser la *m/z* de l'ió precursor, i la *m/z* de l'ió producte que apareixia amb més intensitat en les anàlisis prèvies de PIS dels compostos purs, i que es resumeixen a la *Taula 2.6*.

Compost	Fragments MRM (<i>m/z</i>)	DP	CE
Cafeoïlputrescina	251/163	20	20
Cumaroïlputrescina	235/147	20	20
Feruloïlputrescina	265/177	20	20

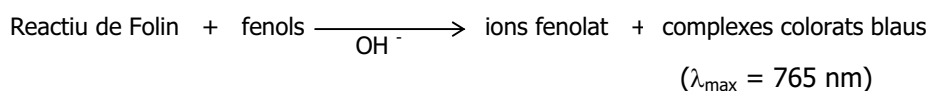
Taula 2.6.- Transicions de MRM, DP i CE dels derivats de poliamines quantificats en el tabac

2.6.- Avaluació del contingut total en compostos fenòlics i de l'activitat antioxidant de les diferents fraccions de l'extracte del lavandí

2.6.1.- Determinació del contingut total en compostos fenòlics (TPhC) pel mètode de Folin-Ciocalteu

Per determinar el TPhC existeixen diferents mètodes basats en mesures colorimètriques, utilitzant un nombre de reactius amb selectivitat variada envers els fenols. Però la gran diversitat d'estructures englobades dins el terme de compostos fenòlics fa que no existeixi un reactiu específic ideal, de manera que és necessària l'elecció d'un reactiu de compromís, o bé la utilització de reactius diferents per determinar compostos específics. Tot i la seva manca d'especificitat, el test de Folin-Ciocalteu és el més utilitzat, ja que és ràpid, senzill i econòmic, i malgrat els seus inconvenients, resulta d'utilitat com a dada orientativa en correlació amb l'activitat antioxidant. Per això, aquest ha estat el mètode escollit per avaluar el TPhC en aquest treball.

El test de Folin-Ciocalteu es basa en una reacció colorimètrica entre els compostos fenòlics i el reactiu de Folin, una solució d'ions polimèrics complexos dels àcids fosfomolíbdic i fosfotúngstic, de color groc, que en medi bàsic oxida ràpidament els fenols a ions fenolat, produint complexos de molibdè-tungstè de color blau. La mesura espectrofotomètrica de l'absorbància de la solució final permet conèixer la concentració total de fenols. Com a compost de referència s'utilitza l'àcid gàl·lic, de manera que els resultats són expressats en equivalents d'àcid gàl·lic (GAE)/mg de pes sec (DW) (Khokhar & Magnusdottir, 2002).



Procediment

Elaboració de la recta patró

Per preparar les mescles de reacció es va partir de diferents quantitats (entre 0 i 1 mL) de solució d'àcid gàl·lic, a una concentració de 50 $\mu\text{g/mL}$. Posteriorment es va afegir la quantitat corresponent de H_2O (especificada a la *Taula 2.7*), 0.5 mL del reactiu de Folin-Ciocalteu (Panreac[®]), i dos minuts més tard 1.5 mL de Na_2CO_3 al 20%. Es va deixar incubar durant 2 hores i, posteriorment, es va llegir l'absorbància de les mostres en un espectrofotòmetre (Hitachi U-2000) a una λ de 765 nm.

Solució d'àcid gàl·lic (mL)	H ₂ O (mL)	Reactiu de Folin-Ciocalteu (mL)	Solució de Na ₂ CO ₃ al 20% (mL)	Equivalents d'àcid gàl·lic (GAE) (µg/10 mL mescla)	Absorbància (nm)
1.0	7.0	0.5	1.5	50	0.589
0.8	7.2			40	0.481
0.6	7.4			30	0.367
0.4	7.6			20	0.256
0.2	7.8			10	0.141
0.1	7.9			5	0.075
0.0	8.0			0	0.017

Taula 2.7.- Taula-guia de la preparació de la recta patró d'àcid gàl·lic, amb els valors d'absorbància obtinguts per cada concentració.

A partir d'aquests valors d'absorbància i concentració es va calcular la recta patró:

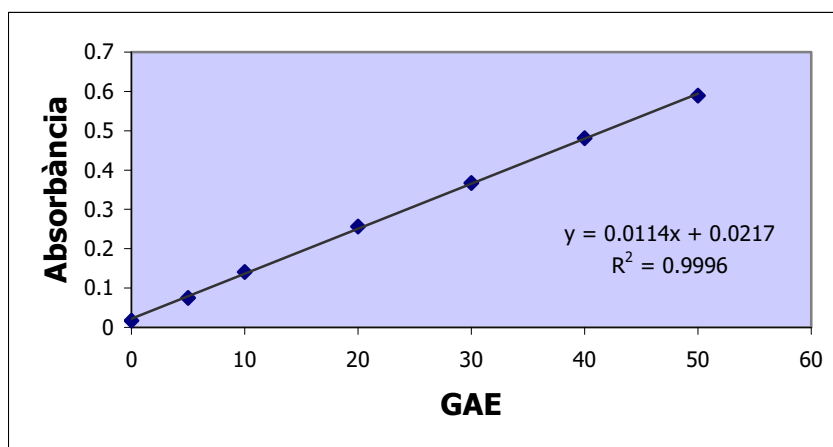


Figura 2.10.- Recta patró corresponent a l'àcid gàl·lic. A partir de l'equació de la recta obtindrem el valor de la pendent: 0.0114

La inversa de la pendent de la recta és el valor **F** que serà necessari per fer els càlculs amb la mostra que es vulgui avaluar. En aquest cas, el valor **F** calculat va ser de **87.72**.

Elaboració de l'assaig

La mescla de reacció va consistir en 0.1 mL d'extracte (o MeOH en el cas del blanc) a una concentració entre 1 i 10 mg/mL segons l'activitat de l'extracte, 7.9 mL de H₂O destil·lada, 0.5 mL de reactiu de Folin-Ciocalteu, i 1.5 mL de solució de carbonat sòdic al 20%. El moment en que s'addiciona el reactiu de Folin és el punt d'inici de la reacció, i la solució de Na₂CO₃ s'afegeix al cap de 2 minuts. La mescla de reacció es va deixar incubar durant 2 hores i, posteriorment, es va mesurar l'absorbància de les solucions colorades de blau en un espectrofotòmetre a una λ de 765 nm. L'assaig es va realitzar per triplicat, i les solucions van ser preparades diàriament.

	Problema (mL)	Control (mL)
Extracte	0.1	-
MeOH	-	0,1
H₂O	7,9	7,9
Reactiu de Folin	0,5	0,5
Na₂CO₃ (20%)	1,5	1,5
Volum total	10 mL	

Taula 2.8.- Taula-guia per la preparació de l'assaig de Folin-Ciocalteu amb la mostra

Càlculs

El TPhC es calcula mitjançant la fórmula següent:

$$\text{TPhC} = \frac{A \text{ mostra} \times F}{C/D \times V} = \text{GAE/mg mostra}$$

A = absorbància

F = inversa de la pendent de la recta-patró de l'àcid gàl·lic

C = concentració de la solució d'extracte

D = dilució

V = volum de la mostra

(en aquest cas D x V = 1/10)

2.6.2.- Determinació de l'activitat antioxidant

Els mètodes de determinació de l'activitat antioxidant són extremadament diversos, i han estat objecte d'un gran nombre de reculls bibliogràfics (Arnao *et al.*, 1999; Abuja & Albertini, 2001; Antolovich *et al.*, 2002; Cos *et al.*, 2002; Sánchez-Moreno, 2002; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006; Naczki & Shahidi, 2006; Hermans *et al.*, 2007). L'activitat antioxidant habitualment es mesura de forma indirecta, és a dir, a través de l'extensió d'una oxidació. La principal limitació, però, és la manca d'un substrat universal per aquest procediment d'oxidació, fet que justificaria el gran nombre de mètodes descrits. La mesura de l'activitat antioxidant, especialment d'antioxidants que són barreges multifuncionals, o bé que actuen en un sistema multifase complex, no pot avaluar-se de forma satisfactòria amb un sol test sense tenir en compte les múltiples variables que poden interferir en els resultats. Així doncs, és convenient la utilització de diferents mètodes per avaluar l'activitat antioxidant d'un producte o extracte (Koleva *et al.*, 2002; Aruoma, 2003; Katsube *et al.*, 2004; Hermans *et al.*, 2007).

En una reacció d'oxidació hi intervenen el substrat, l'oxidant, l'iniciador, els productes intermediaris i el producte final. La mesura de qualsevol d'aquests paràmetres pot ser utilitzada per valorar l'activitat antioxidant, donant lloc a múltiples estratègies analítiques vàlides.

Els mètodes per determinar l'activitat antioxidant dels compostos fenòlics inclouen tests *in vitro* i *in vivo*. Els tests *in vitro* resulten molt útils, ja que són ràpids, senzills, i de resultats més fàcilment reproduïbles gràcies a la facilitat d'estandarditzar i validar les condicions d'assaig. Per contra, les dades que proporcionen són difícils d'extrapolar a sistemes biològics. Els tests *in vivo*, en canvi, tot i que són difícils de portar a terme per la dificultat de reproduir les condicions fisiològiques capaces d'influir en la biodisponibilitat dels compostos un cop ingerits, presenten l'avantatge de tenir en compte si aquests s'absorbeixen, i si mantenen l'activitat després de ser absorbits i metabolitzats en l'organisme. Així, caldrien estudis *in vivo* per determinar si el potencial antioxidant trobat en els assaigs *in vitro* realment es manté en un sistema biològic. Cal diferenciar, doncs, entre activitat antioxidant i capacitat antioxidant. En els sistemes biològics es parlaria de capacitat antioxidant, mentre que en sistemes *in vitro* es parlaria d'activitat antioxidant, entesa com la suma de totes les activitats antioxidants d'una barreja de molts antioxidants, per exemple un extracte vegetal o aliment. Els mètodes descrits per a la determinació de l'activitat antioxidant es poden dividir en dos grans grups: aquells que avaluen la peroxidació lipídica, i aquells que mesuren la capacitat de captar radicals lliures (Antolovich *et al.*, 2002; Sánchez-Moreno, 2002; Hermans *et al.*, 2007).

En el present treball, per la seva facilitat d'anàlisi i reproductibilitat de resultats, s'han utilitzat tres assaigs diferents basats en la mesura de la capacitat captadora de radicals lliures dels compostos fenòlics: el mètode de determinació de l'activitat captadora del radical DPPH', la determinació de l'activitat captadora del radical $\cdot\text{OH}$ pel mètode de quimioluminescència del luminol induïda per Co(II)/EDTA, i la determinació de l'activitat captadora del radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ pel mètode del nitro-blue tretazolium (NBT^{2+}) i el sistema hipoxantina/xantina-oxidasa.

2.6.2.1.- Determinació de la capacitat captadora del radical DPPH'

El radical sintètic 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil hidratat (DPPH') és de color violeta intens, i serveix, a la vegada, de radical susceptible de ser reduït i d'indicador de la reacció, ja que el seu color es perd quan passa a la seva forma reduïda (DPPH-H), gràcies a la donació d'un electró per part d'un antioxidant antiradicalari (AH) (Figura 2.11). La mesura espectrofotomètrica de la disminució de la coloració a $\lambda_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$ permet la determinació de l'activitat antioxidant de l'espècie donadora d'electrons. Per determinar aquesta activitat, es calcula la concentració inhibidora 50 (IC_{50}), paràmetre àmpliament utilitzat per la mesura i comparació de la capacitat captadora de radicals lliures de diferents mostres (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998; Robards, 2003).

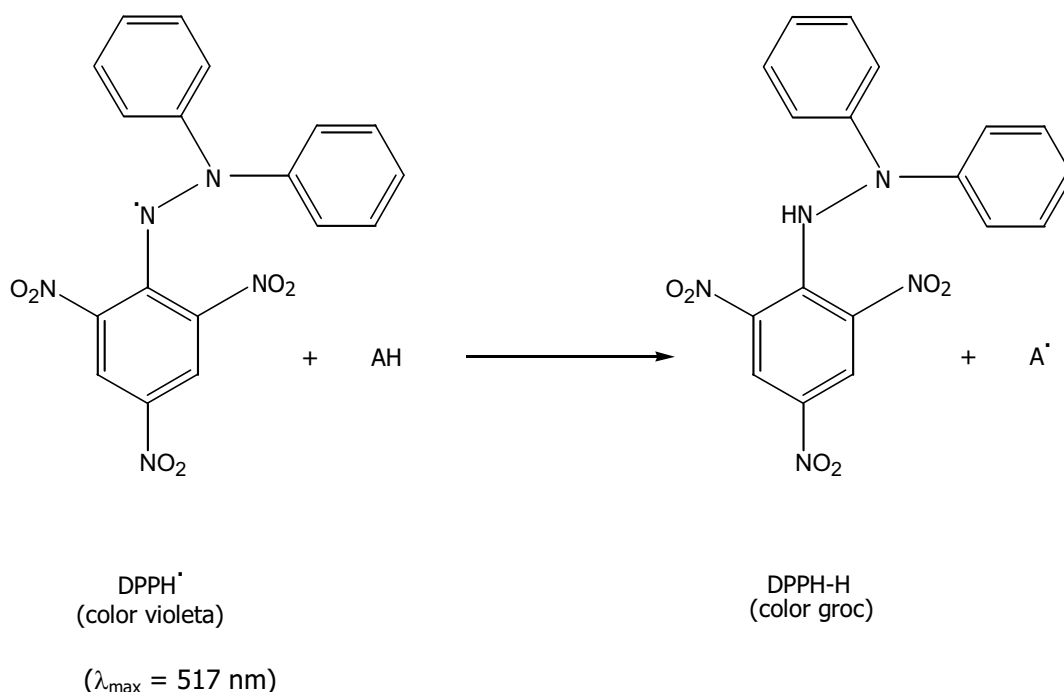


Figura 2.11.- Reacció entre el radical DPPH' i un agent antioxidant donador d'electrons (AH)

Procediment

Elaboració de l'assaig

Es va preparar una solució metanòlica del radical DPPH' (Sigma®) de 20 µg/mL i solucions metanòliques de la mostra a assajar a diferents concentracions, segons l'activitat de l'extracte, per exemple: 50, 25, 10, 7.5 i 5 µg/mL. A continuació es van mesclar 750 µL de solució problema (o de MeOH en cas del blanc) amb 1500 µL de solució metanòlica de DPPH', i es va incubar a la foscor durant 20 minuts. Posteriorment es van mesurar les absorbàncies de les solucions en l'espectrofotòmetre. L'assaig es va realitzar per triplicat.

	MeOH (µL)	Solució d'extracte (µL)	Solució DPPH' 20 µg/mL (µL)
Control	750	-	1500
Problema	-	750	
Volum total	2.25 mL		

Taula 2.9.- Taula-guia per la realització de l'assaig DPPH'

Càlculs

La capacitat de decoloració de la mostra respecte el blanc es va calcular mitjançant la fórmula següent:

$$\% \text{ decoloració} = \left(1 - \frac{A \text{ mostra}}{A \text{ blanc}} \right) \times 100$$

A mostra = absorbància de la mostra

A blanc = absorbància del blanc

Per calcular la IC₅₀ es va fer una recta de regressió del percentatge de decoloració en front la concentració de la mostra. El valor es va obtenir a partir de l'extrapolació d'un 50% de decoloració a la recta. De cada triplicat va obtenir-se una recta patró i una IC₅₀, i es va calcular la desviació estàndard dels tres valors.

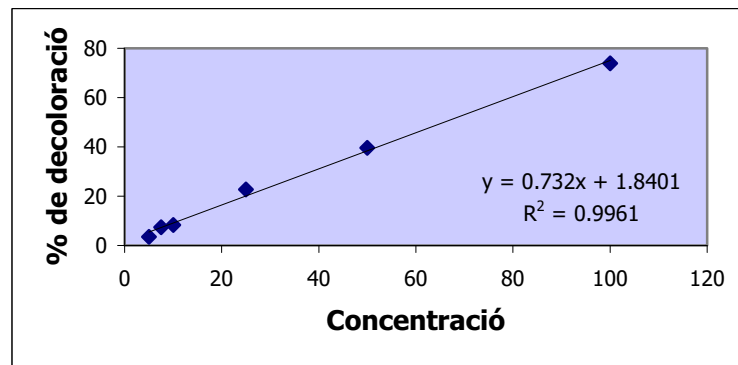


Figura 2.12.- Gràfica d'exemple on es representen els % de decoloració a diferents concentracions de mostra en un test de DPPH

2.6.2.2.- Determinació de la capacitat captadora del radical $\cdot\text{OH}$ pel mètode de quimioluminescència del luminol induïda per Co(II) /EDTA

Aquest mètode es basa en la reacció quimioluminescent de la molècula de luminol amb el radical $\cdot\text{OH}$ (Figura 2.13). L'addició de captadors de radicals lliures dóna lloc a la disminució de la intensitat d'aquesta quimioluminescència, quantificable mitjançant un luminòmetre. La quantificació d'aquesta disminució d'intensitat de la quimioluminescència permet avaluar la capacitat antioxidant de la substància captadora de radicals lliures. La producció de radicals $\cdot\text{OH}$ al medi de reacció es basa en la reacció de Fenton a partir de H_2O_2 , catalitzada per Co(II) (Figura 2.13) (Parejo *et al.*, 2000, Parejo *et al.*, 2002).

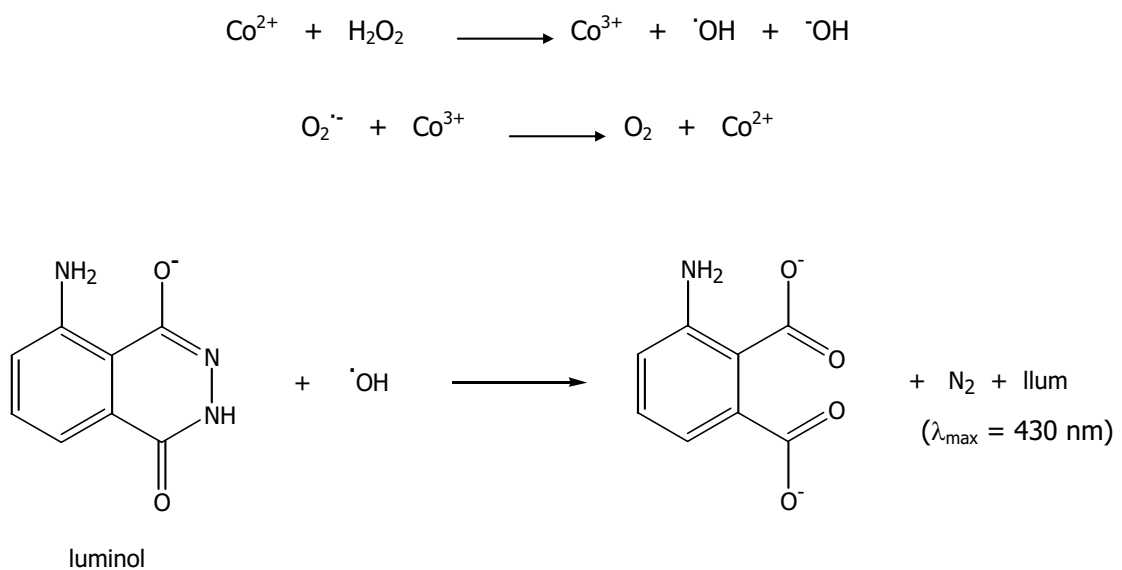


Figura 2.13.- Reacció de Fenton catalitzada per Co(II) , i reacció simplificada entre el luminol i el radical $\cdot\text{OH}$

Procediment

Elaboració de l'assaig

Per portar a terme aquest assaig de quimioluminescència (CL), es van preparar una sèrie de solucions: una solució tampó d'àcid bòric a pH 9, una solució de luminol (100 µg/mL), una solució de Co(II) (200 µg/mL) i EDTA (1 mg/mL), i una solució de H₂O₂ a una concentració de 0.05 M. Les solucions del tampó d'àcid bòric i de H₂O₂ es van preparar en H₂O destil·lada, mentre que les solucions de luminol i Co(II)/EDTA en el tampó d'àcid bòric. Paral·lelament es van fer diferents dilucions de la mostra a assajar, per exemple 100, 75, 50, 25, 10 i 5 µg/mL en MeOH. Tots els reactius (luminol, Co(II) i EDTA) van obtenir-se de la casa comercial Sigma®. Les solucions es van mesclar en un tub d'assaig. La reacció comença en el moment en que s'afegeix el H₂O₂. La mescla es va incubar durant 30 minuts a la foscor i, posteriorment, es va llegir la intensitat de quimioluminescència emesa en un luminòmetre (Berthold LB 9507). Cada concentració de mostra es va assajar per triplicat, i també es va fer un blanc de control amb MeOH.

	Problema (µL)	Blanc (µL)
Solució Co(II)/EDTA tampó d'àcid bòric	300	300
Solució de luminol	25	25
MeOH	-	25
Extracte	25	-
H₂O₂	50	50
Volum total de l'assaig	400 µL	

Taula 2.10.- Taula-guia per la realització de l'assaig de CL

Càlculs

Per calcular l'activitat captadora de l'extracte es va aplicar la següent fórmula:

$$AA = \left(1 - \frac{I}{I_0}\right) \times 100$$

AA = activitat captadora de radicals $\cdot\text{OH}$ de l'extracte (%)

I_0 = promig de les mesures de la intensitat de quimioluminescència emesa pel blanc (URL)

I = promig de les mesures de la intensitat de quimioluminescència emesa per la mostra (URL)

(URL = Unitats relatives de llum)

Per avaluar l'activitat antioxidant, també es va calcular el paràmetre IC_{50} , a partir d'una recta de regressió del percentatge d'activitat captadora en front la concentració de la mostra. Per cada triplicat es va obtenir una recta de regressió i un valor IC_{50} , dels quals es van calcular les desviacions estàndard.

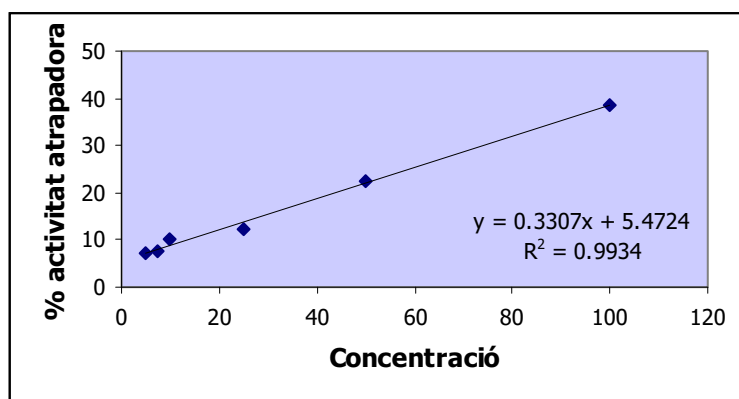


Figura 2.14.- Gràfic d'exemple on es representen % d'activitat atrapadora a diferents concentracions de mostra en un test de CL

2.6.2.3.- Determinació de la capacitat captadora del radical $O_2^{\cdot-}$ pel mètode del nitro-blue tretazolium (NBT^{2+}) i el sistema hipoxantina/*xantina-oxidasa*

La *xantina-oxidasa* és un enzim capaç de generar radicals $O_2^{\cdot-}$ per l'oxidació de l'hipoxantina a xantina, en medi aquós. Aquests radicals, al seu torn, són capaços de reduir compostos com el nitro-blue tretazolium (NBT^{2+}) a formazan, cromòfor de color blau que presenta el seu màxim d'absorció a una λ de 560 nm (*Figura 2.15*).

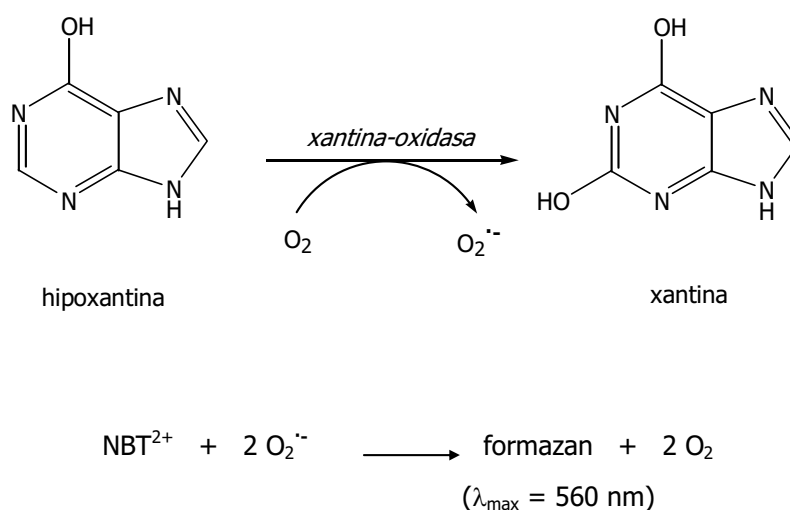


Figura 2.15.- Reacció de formació de xantina a partir d'hipoxantina en medi aquós mitjançant l'enzim *xantina-oxidasa*, amb la corresponent producció de $O_2^{\cdot-}$, i reacció de formació de formazan a partir de NBT^{2+}

Aquells principis actius que són capaços de captar el radical $O_2^{\cdot-}$ disminueixen la velocitat de formació del cromòfor. Aleshores, es pot calcular l'activitat antioxidant dels compostos assajats mitjançant la quantificació de la disminució de la velocitat de formació d'aquest cromòfor (Paya *et al.*, 1992, Masaki *et al.*, 1995).

Aquest mètode enzimàtic mesura, doncs, l'activitat captadora de radicals $O_2^{\cdot-}$, tot i que alguns compostos com els flavonoides presenten, a més, activitat inhibidora de la *xantina-oxidasa*. Així, la disminució d'absorbància que provoquen els flavonoides, serà deguda tant a la captació de radicals $O_2^{\cdot-}$, com a la disminució de producció d'aquests radicals per la inhibició de la *xantina-oxidasa* (Cos *et al.*, 1998).

Procediment

Elaboració de l'assaig

Per portar a terme l'assaig de la *xantina-oxidasa* (XO), es va partir de mostres dels diferents extractes a una concentració de 500 µg/mL dissolts en H₂O destil·lada. Es va preparar una solució de tampó fosfat (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) per mantenir el pH constant a 7.5, una solució d'hipoxantina (Sigma®) a una concentració de 0.2 mM, una solució de NBT²⁺ (Sigma®) 1 mM i una solució de l'enzim *xantina-oxidasa* (Sigma®) a una concentració de 1.2 U/mL. També es va necessitar H₂O destil·lada per la realització dels blancs.

Els reactius es van mesclar segons la *Taula 2.11*. L'enzim va ser l'últim reactiu a afegir, just abans de llegir l'absorbància a l'espectrofotòmetre. En el moment de l'addició de la *xantina-oxidasa* comença la reacció d'oxidació de l'hipoxantina a xantina, amb la conseqüent formació del radical O₂⁻. Aquest radical reacciona amb el NBT²⁺ i es comença a formar el formazan. La lectura de l'absorbància es va fer a una λ de 560 nm, just en el moment en que es va arribar al màxim d'absorbància, que correspon a la finalització de la reacció. L'assaig es va realitzar per triplicat, minimitzant l'exposició a la llum. Per tal de verificar la correcció de l'assaig, es va fer un control paral·lel amb quercetina (Sigma®). També es van realitzar blancs en els quals no es va afegir enzim, tant en la mostra, com en el control amb H₂O, i en el control amb quercetina.

	Blanc control (µL)	Control (µL)	Blanc quercetina (µL)	Quercetina (µL)	Blanc mostra (µL)	Mostra (µL)
Tampó fosfat	380	380	380	380	380	380
Solució d'hipoxantina 0,2 mM	63	63	63	63	63	63
H₂O destil·lada	126	63	63	-	63	-
Quercetina (500 µg/mL)	-	-	63	63	-	-
Mostra (500 µg/mL)	-	-	-	-	63	63
Solució NBT²⁺ (500 µg/mL)	63	63	63	63	63	63
Solució de <i>xantina-oxidasa</i> (1.2 U/mL)	-	63	-	63	-	63
Volum total	632 µL					

Taula 2.11.- Taula-guia per la realització de l'assaig de la XO

Càlculs

La capacitat captadora del radical $O_2^{\cdot -}$ s'expressa en % de captació, i es va calcular aplicant la següent fórmula:

$$\% \text{ captació} = \left(\frac{C-M}{C} \right) \times 100$$

C = absorbància control - absorbància blanc control

M = absorbància mostra - absorbància blanc mostra

3.1.- Lavandí

3.1.1.- Extracció i fraccionament

En l'extracció inicial varen obtenir-se un total de 66.51 g de **E1**. De la seva posterior partició es varen obtenir 3.44 g de **EHx**, 9.48 g de **EAE**, i 27.45 g de **EAq**.

3.1.2.- Contingut total en compostos fenòlics (TPhC) i activitat antioxidant

Els valors obtinguts de l'avaluació del TPhC i de l'activitat antioxidant (*apartat 2.6*) es mostren a la *Taula 3.1*. Aquests resultats confirmen que el material de rebuig del lavandí té una clara activitat antioxidant i conserva un important contingut en compostos fenòlics després de la destil·lació dels olis essencials. Aquest procés de destil·lació es porta a terme a elevades temperatures, però, tot i que aquestes, de vegades, poden alterar alguns compostos com antocianines o flavonols (Tomás-Barberán & Espín, 2001), aquesta degradació no sol ser gaire significativa (Buchner *et al.*, 2006). A més, el tractament tèrmic pot inhibir enzims com *polifenol-oxidases (PPO)* i *peroxidases (POD)*, responsables de la degradació oxidativa dels compostos fenòlics, fet que pot contribuir a la conservació d'aquests compostos (Tomás-Barberán & Espín, 2001; Pourcel *et al.*, 2007).

	TPhC (GAE/mg) ± SD	Activitat antioxidant		
		DPPH [•] IC ₅₀ ± SD (µg/mL)	CL IC ₅₀ ± SD (µg/mL)	XO AA (%) ± SD (500 µg/mL)
E1	59.96 ± 1.65	168.51 ± 18.49	69.49 ± 5.91	32.88 ± 4.86
EHx	41.56 ± 2.43	631.70 ± 91.20	109.36 ± 16.03	7.68 ± 1.31
EAE	240.01 ± 13.24	40.63 ± 5.91	10.82 ± 4.61	68.16 ± 2.61
EAq	32.56 ± 1.99	421.48 ± 42.73	187.88 ± 22.29	25.34 ± 5.68
A	124.53 ± 9.71	190.34 ± 23.27	19.10 ± 1.92	19.34 ± 2.49
B	423.82 ± 13.79	57.01 ± 5.72	5.25 ± 0.52	60.99 ± 1.67
C	783.36 ± 24.61	7.98 ± 0.97	7.67 ± 0.28	81.48 ± 1.70
BHA	-	9.70 ± 0.92	2.14 ± 0.01	67.51 ± 0.30
Quercetina	-	6.11 ± 0.53	5.13 ± 0.12	97.45 ± 3.25

Taula 3.1.- Contingut total en compostos fenòlics i activitat antioxidant resultant dels tres assaigs antiradicalaris (DPPH[•], CL, i XO) dels diferents extractes del material de rebuig del lavandí (**E1**, **EHx**, **EAE**, **EAq**) i de les fraccions de **EAE** (**A**, **B** i **C**), comparat amb els valors obtinguts dels compostos de referència BHA i quercetina. SD, desviació estàndard calculada de 10 replicats.

L'extracte **EAE** va resultar el més actiu en tots els assaigs d'activitat antioxidant, amb una IC_{50} de 40.63 i 10.82 $\mu\text{g/mL}$ en els assaigs de DPPH' i CL respectivament, i una activitat antioxidant d'un 68.16% en l'assaig de XO. L'activitat antioxidant de l'extracte **EAE** es va correspondre amb el TPhC, ja que aquest extracte també va ser el que va mostrar els valors més elevats (240.01 GAE/mg). Aquests resultats indicaven que l'extracte **EAE** era el més adient per realitzar la posterior identificació de compostos fenòlics responsables de l'activitat antioxidant. Així, es va procedir a una posterior purificació i fraccionament d'aquest extracte amb una cromatografia de gel-filtració amb suport de Sephadex® (veure *apartat 2.3.2*).

Les fraccions **A**, **B** i **C** obtingudes de **EAE** van ser també avaluades en el TPhC i en l'activitat antioxidant. El major TPhC es va trobar a la fracció **C** (783.36 GAE/mg). Aquesta fracció també va mostrar una activitat antioxidant més elevada en els assaigs de DPPH' (IC_{50} de 7.98 $\mu\text{g/mL}$) i de XO (81.48% d'activitat antioxidant). L'activitat antioxidant resultant d'aquest darrer assaig va ser superior a la del compost de referència BHA (butilhidroxianisol). D'altra banda, però, la fracció **B** va mostrar l'activitat captadora del radical $\cdot\text{OH}$ en el test de CL més elevada (IC_{50} de 5.25 $\mu\text{g/mL}$), tot i que la quantitat de compostos fenòlics era menor que en la fracció **C**.

3.1.3.- Identificació de compostos fenòlics per LC-MS/MS

En base a la composició química del gènere *Lavandula* (Areias *et al.*, 2000; Upson *et al.*, 2000; Harborne & Williams, 2002) es varen programar diferents experiments de tàndem MS/MS (*Product ion scan*, *Precursor ion scan* i *Neutral loss scan*). A més, es van assajar els DP i CE òptims per la correcta fragmentació de cada tipus de molècula. Varen identificar-se un total de 23 compostos fenòlics per primera vegada en el material de rebuig del lavandí, compostos que tampoc havien estat anteriorment identificats en la planta de lavandí, amb l'excepció de l'àcid rosmarínic, que s'havia trobat en els seus cultius cel·lulars (López-Arnaldos *et al.*, 1997). Els resultats de la identificació, així com els temps de retenció (t_R), els experiments realitzats, i els DP i CE es resumeixen a la *Taula 3.2*.

Pic	Compost	t_R (min)	Fracció	[M – H] ⁻	Experiments MS/MS				DP(v) CE(v)
					Product ion scan (<i>m/z</i>)	Fragments (<i>m/z</i> (abundància relativa, %))	Neutral loss scan (<i>u</i>)	Precursor ion scan (<i>m/z</i>)	
1	Àcid protocatèquic	5.69	C	153	153	109 (100)			-60 -35
2	Àcid cumàric- <i>O</i> -glucòsid 1	13.65	B	325	325	119 (100), 163 (20)	162		-60 -35
3	Àcid cafeic	15.28	C	179	179	135 (100)			-60 -35
4	Àcid ferúlic- <i>O</i> -glucòsid 1	16.98	B	355	355	149 (100), 193 (20)	162		-60 -35
5	Àcid cumàric- <i>O</i> -glucòsid 2	19.39	B	325	325	119 (100), 163 (20)	162		-60 -35
6	Àcid trihidroxicinàmic- <i>O</i> -glucòsid	19.47	B	357	357	151 (30), 177 (20), 195 (100)	162		-60 -30
7	Àcid 3- <i>O</i> -cafeoilquínic (àcid clorogènic)	20.50	B	353	353	119 (100), 173 (80), 179 (60), 191 (100)			-60 -35
8	Àcid cafeic- <i>O</i> -glucòsid 1	21.63	B	341	341	135 (100), 179 (80)	162		-60 -35
9	Àcid ferúlic- <i>O</i> -glucòsid 2	21.75	B	355	355	149 (100), 193 (20)	162		-60 -35
10	Eriodictiol- <i>O</i> -hexòsid	22.42	B	449	449	135 (100), 151 (80), 287 (20)	162		-60 -30
11	Àcid cafeic- <i>O</i> -glucòsid 2	22.90	B	341	341	135 (100), 179 (80)	162		-60 -35
12	Quercetina-3- <i>O</i> -glucòsid (isoquercitrina)	23.61	C	463	463	151 (<5), 179 (<5), 301 (100)	162	301	-60 -35
13	Luteolina- <i>O</i> -hexòsid 1	23.69	C	447	447	285 (100), 447 (10)	162	285	-60 -30
					285	133 (100), 151 (20), 285 (50)			-80 -40
14	Crisoeriol- <i>O</i> -hexòsid	23.73	C	461	461	285 (100), 299 (80)	162	299	-60 -35
15	Apigenina- <i>O</i> -hexòsid	26.00	C	431	431	269 (100), 431 (10)	162		-60 -35
16	Luteolina- <i>O</i> -hexòsid 2	26.42	C	447	447	285 (100), 447 (10)	162	285	-60 -30
					285	133 (100), 151 (20), 285 (50)			-80 -40
17	Crisoeriol- <i>O</i> -glucurònid	28.86	C	475	475	285 (60), 299 (70)	176	299	-60 -30
18	Luteolina- <i>O</i> -glucurònid 1	29.58	C	461	461	285 (100), 461 (10)	176	285	-60 -30
					285	133 (100), 151 (20), 285 (50)			-80 -40
19	Àcid rosmarínic	31.60	C	359	359	161 (100), 179 (25), 197(20)			-60 -35
20	Àcid rosmarínic metilèster	33.12	C	373	373	135 (80), 179 (100)			-60 -35
21	Luteolina- <i>O</i> -glucurònid 2	34.57	C	461	461	285 (100), 461 (10)	176	285	-60 -30
					285	133 (100), 151 (20), 285 (50)			-80 -40
22	Apigenina	35.20	C	269	269	117 (100), 151 (90)			-60 -35
23	Luteolina- <i>O</i> -glucurònid 3	35.61	C	461	461	285 (100), 461 (10)	176	285	-60 -30
					285	133 (100), 151 (20), 285 (50)			-80 -40

Taula 3.2.- Compostos fenòlics identificats en el material de rebuig del lavandí per LC-MS/MS, amb el temps de retenció (t_R), la fracció on han estat trobats, i els fragments característics obtinguts en els diferents experiments MS/MS realitzats

3.1.3.1.- Àcids benzoics i hidroxicinàmics, i derivats hidroxicinamoilquínics

A la fracció **C** es va trobar un àcid benzoic (pic **1**) i un àcid hidroxicinàmic (pic **3**), que van ser identificats temptativament com a àcid protocatèquic i àcid cafeic respectivament. L'espectre de masses en *Full scan* del pic **1** va presentar un ió de m/z 153, que corresponia a la molècula desprotonada $[M - H]^-$. L'experiment de *Product ion scan* (PIS) d'aquest ió va donar com a resultat l'ió m/z 109, que va correspondre a la pèrdua del grup carboxílic $[M - H - COO]^-$. El pic **3** va mostrar un ió $[M - H]^-$ de m/z 179 en l'espectre de masses en *Full scan*, amb el fragment característic de m/z 135 després de l'experiment de PIS d'aquest ió, que corresponia al patró de fragmentació de l'àcid cafeic (Sánchez-Rabareda *et al.*, 2003a; Sánchez-Rabareda *et al.*, 2003b). El pic **7**, només detectat en la fracció **B**, va mostrar un ió $[M - H]^-$ de m/z 353, el qual, després de la fragmentació per PIS, va proporcionar un ió fragment base de m/z 191, i un ió fragment secundari prominent de m/z 179. Aquest compost va ser identificat com a àcid 3-*O*-cafeoilquínic (àcid clorogènic) d'acord amb Clifford *et al.*, 2003. També varen identificar-se altres derivats de l'àcid cafeic, com l'àcid rosmarínic (pic **19**) i el seu derivat metilèster (pic **20**). Aquests compostos, d'ions $[M - H]^-$ de m/z 359 i 373 respectivament, són característics de la família Lamiaceae, i tenen en comú el fragment iònic de m/z 179, característic dels derivats de l'àcid cafeic (Parejo *et al.*, 2004a).

3.1.3.2.- Glucòsids d'àcids hidroxicinàmics

Els 7 glucòsids d'àcids hidroxicinàmics identificats van ser trobats a la fracció **B**. Experiments MS/MS de *Neutral loss* (NL) de 162 u van revelar l'existència d'aquests glucòsids, i els PIS dels corresponents $[M - H]^-$ van confirmar les seves identitats. Un NL de 162 u podria també indicar una pèrdua de galactosa en lloc de glucosa, però, fins al moment, no s'han descrit glucòsids d'àcids hidroxicinàmics en la bibliografia, de manera que el més probable és que es tracti de glucòsids (Clifford *et al.*, 2007). Així, els pics **2** i **5** van ser temptativament identificats com a glucòsids de l'àcid cumàric, ambdós amb un ió $[M - H]^-$ de m/z 325, i ions fragments de m/z 163 i 119; els pics **4** i **9** com a glucòsids de l'àcid ferúlic, ambdós amb un ió $[M - H]^-$ de m/z 355, i ions fragments de m/z 163 i 149; i els pics **8** i **11** com a glucòsids de l'àcid cafeic, ambdós amb un ió $[M - H]^-$ de m/z 341, i ions fragments de m/z 179 i 135. El patró de fragmentació de tots aquests compostos es va correspondre amb el descrit per Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2004.

El fet que els primers compostos eluïts en la columna tinguin un grup àcid lliure, sembla indicar que els primers derivats d'àcids hidroxicinàmics eluïts (**2**, **4** i **8**) podrien tenir el grup àcid de la part cinamoil lliure, mentre que els compostos **5**, **9** i **11** podrien tenir aquest grup esterificat amb el sucre.

El pic **6** va mostrar un ió $[M - H]^-$ de m/z 357, i ions fragment de m/z 195, 177, i 151. La injecció d'aquesta fracció en mode NL de 162 u va confirmar que aquest compost es tractava d'un glucòsid, mentre que la fragmentació de la part àcida per PIS era característica de l'àcid trihidroxicinàmic (Fang *et al.*, 2002), donant lloc a la identificació temptativa d'aquest compost com àcid trihidroxicinàmic-*O*-glucòsid, tal com es mostra en la *Figura 3.1*. Tot i que no existeixen referències de la detecció d'aquest compost per LC-MS, s'ha trobat l'àcid trihidroxicinamoilquínic en prunes (Fang *et al.*, 2002). La presència d'aquest glucòsid en el lavandí podria suggerir un mecanisme alternatiu en la síntesi de l'àcid gàl·lic per una β -oxidació de l'àcid trihidroxicinàmic (Werner *et al.*, 1997). A més, els derivats hidroxicinàmics trihidroxilats han demostrat una activitat citotòxica i antiproliferativa superior als dihidroxilats com l'àcid cafeic, així com una activitat captadora de radicals lliures més elevada (Gomes *et al.*, 2003). Aquests efectes s'incrementen per la presència d'una insaturació en la cadena carbonada, que no és present a l'àcid gàl·lic (Fiuza *et al.*, 2004). Així doncs, amb la presència dels tres grups hidroxil i de la insaturació en la cadena carbonada, l'àcid trihidroxicinàmic compliria amb dues característiques bàsiques per una bona activitat citotòxica i captadora de radicals lliures.

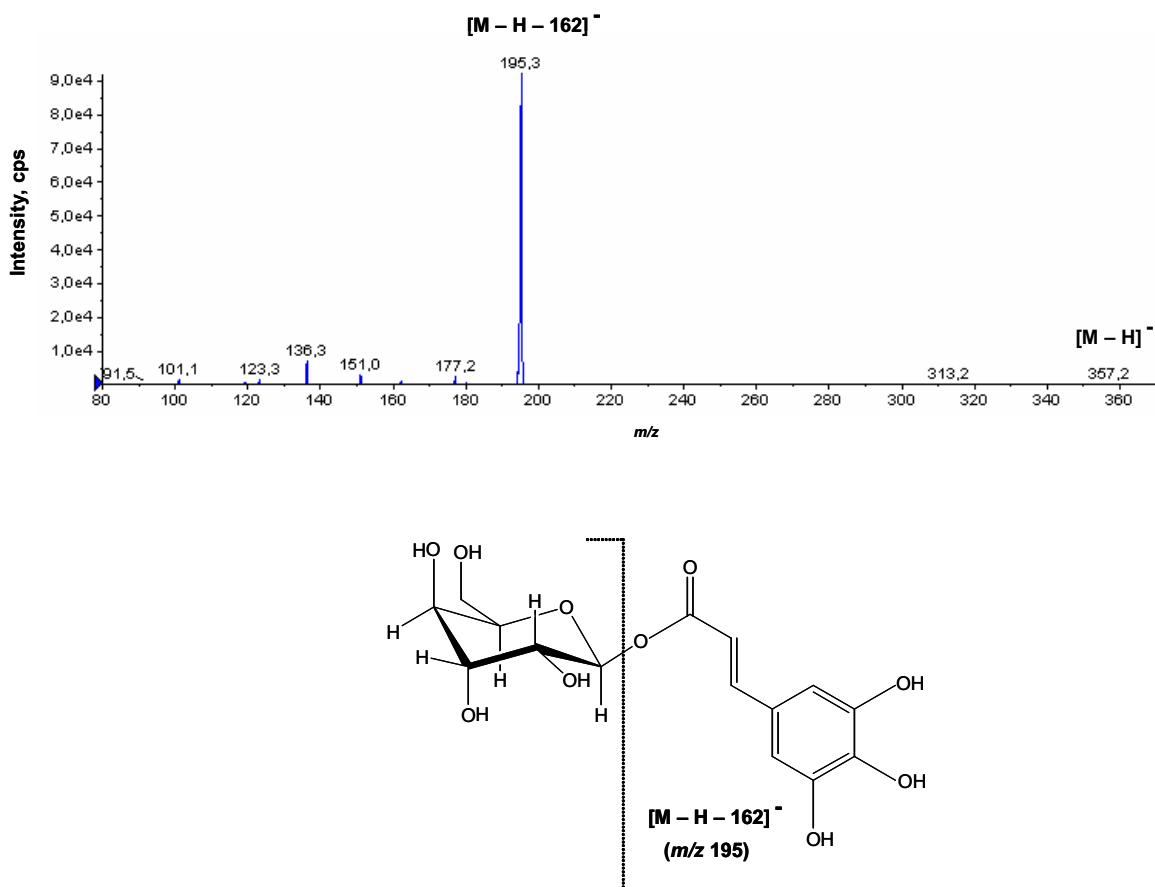


Figura 3.1.- Experiment de PIS de $[M - H]^-$ de l'àcid trihidroxicinàmic-*O*-glucòsid (357), amb els fragments característics obtinguts després de la fragmentació (195, 177, i 151), i la possible estructura del compost

3.1.3.3.- Flavonoides

Tots els flavonoides van ser trobats en la fracció **C**, excepte l'eriodictiol-*O*-hexòsid (pic **10**), que ho va ser a la fracció **B**. Els experiments de NL de 162 u van revelar la presència d'altres 5 hexòsids de flavonoides, que van ser identificats com a isoquercitrina (quercetina-3-*O*-glucòsid) (pic **12**), luteolina-*O*-hexòsids (pics **13** i **16**), crisoeriol-*O*-hexòsid (pic **14**), i apigenina-*O*-hexòsid (pic **15**). D'altra banda, experiments de NL de 176 u van revelar la presència de 4 glucurònids de flavonoide: el crisoeriol-*O*-glucurònid (pic **17**), i tres luteolina-*O*-glucurònids (pics **18**, **21** i **23**). A la fracció **C** també es va identificar una aglicona, l'apigenina (pic **22**). La identificació dels flavonoides es va fer per comparació amb compostos estàndard i amb dades bibliogràfiques (Parejo *et al.*, 2004c; Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2004). Els ions fragments van ser confirmats per experiments de PIS. El fet que els enllaços entre el sucre i l'aglicona fossin C-O també es va confirmar pels experiments de PIS, ja que no mostraven els fragments de 120 i 90 *m/z*, característics dels enllaços C-C (Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2003a).

Els espectres de masses de la luteolina i el kaempferol presenten el mateix ió $[M - H]^-$ de m/z 285. L'experiment de PIS d'aquest ió dóna com a resultat els mateixos ions producte per ambdues molècules, però amb intensitats relatives diferents, ja que la luteolina presenta un major grau de fragmentació que el kaempferol a les mateixes intensitats de DP i CE. Aleshores, els derivats de luteolina trobats en la fracció **C** van ser identificats mitjançant la comparació de les intensitats relatives dels fragments resultants del PIS amb les de compostos estàndard (*Figura 3.2*).

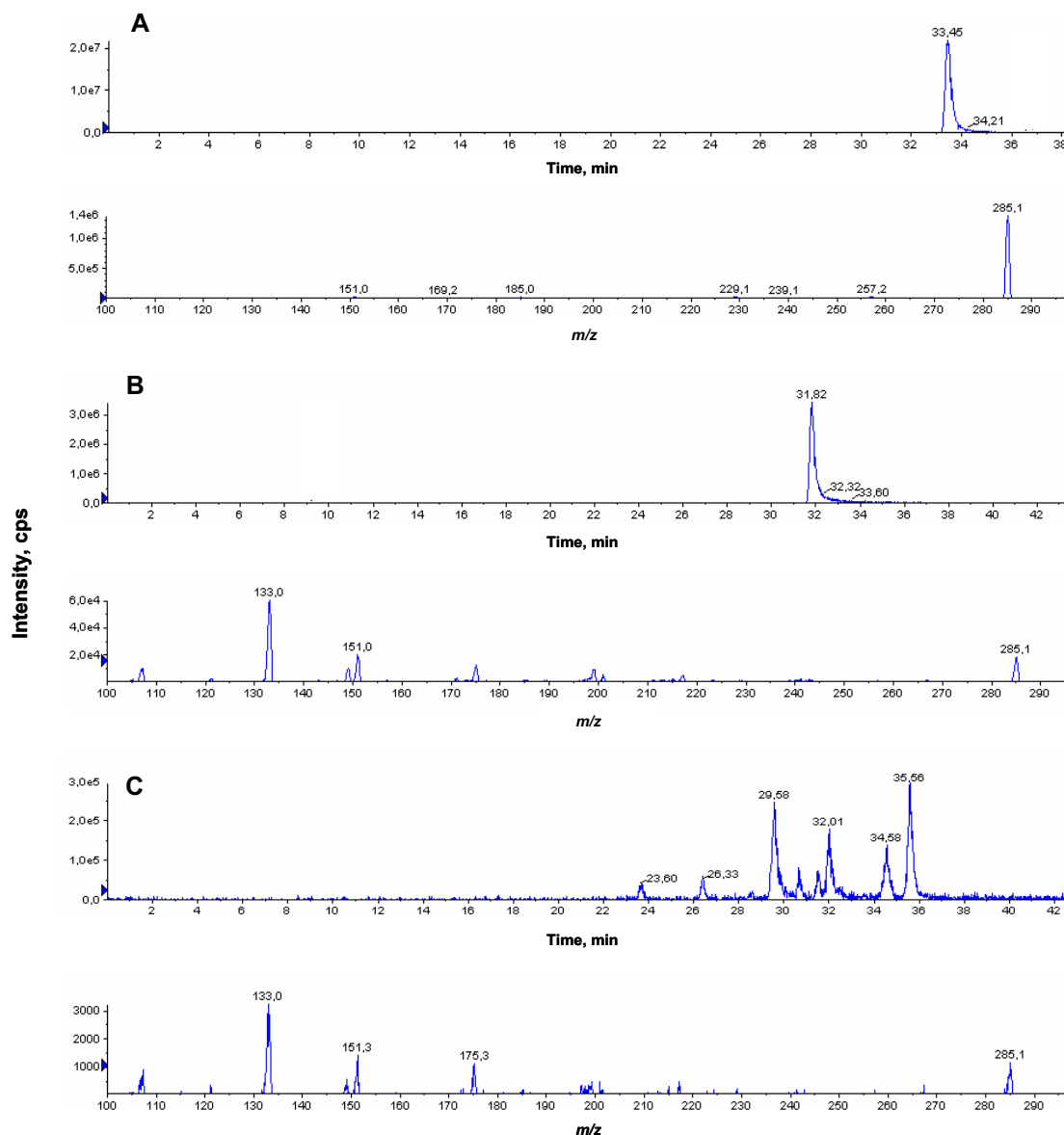


Figura 3.2.- Cromatogrames i espectres de masses dels experiments de PIS de $[M - H]^-$ de m/z 285 a un DP de 60 i un CE de 40, dels compostos estàndard de kaempferol (A) i de luteolina (B), i de la fracció C (C). Es pot comprovar la diferent intensitat de fragmentació del kaempferol i la luteolina, i la correspondència de la fracció C amb la fragmentació de la luteolina

La presència de derivats d'eriodictiol i l'absència de derivats de kaempferol sembla indicar que, en aquesta planta, la quercetina s'origina a partir de l'eriodictiol i la dihidroquercetina, tal com es mostra en la *Figura 3.3*. És interessant destacar, també, la important presència de flavones (apigenina, luteolina i crisoeriol) en el lavandí, especialment de luteolina. D'altra banda, el fet que la majoria de flavonoides identificats (excepte l'apigenina) requereixin l'enzim *flavonoid-3'-hidroxilasa (F3'H)* per la seva síntesi, pot suggerir que aquest enzim té una activitat elevada en aquesta planta.

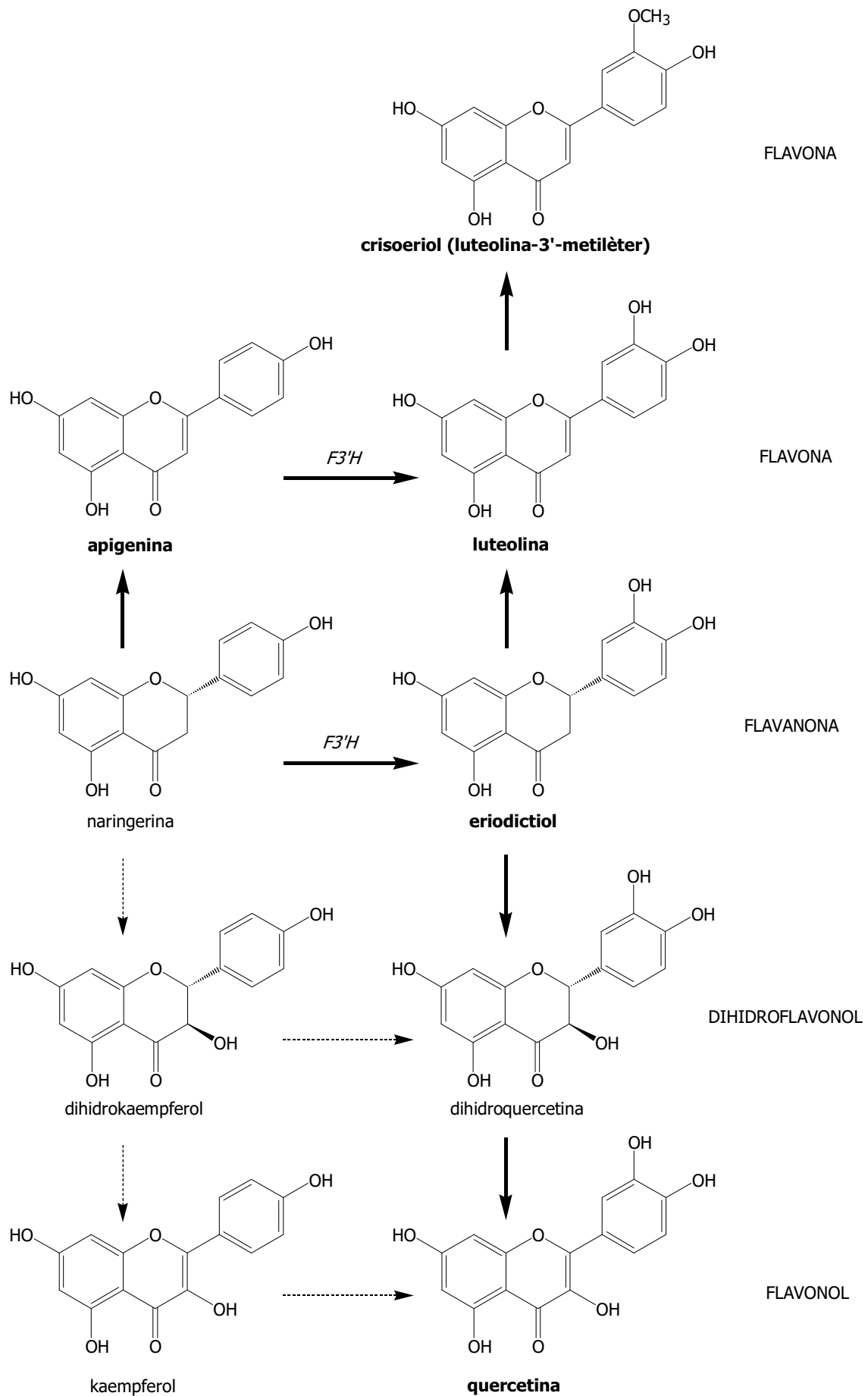


Figura 3.3.- Camins metabòlics de les principals aglicones. Amb fletxes negres s'indiquen aquells proposats pel lavandí.

3.1.4.- Relacions d'estructura-activitat antioxidant dels compostos identificats

Tal com s'ha exposat en la introducció, l'activitat antioxidant es pot manifestar per diferents mecanismes.

La fracció **C**, la composició de la qual es basa principalment en flavonoides, és la més activa davant els assaigs antioxidants de DPPH' i XO. En aquest últim assaig els flavonoides poden actuar tant neutralitzant els radicals $O_2^{\cdot-}$ produïts, com disminuint la seva producció a través de la inhibició de la *xantina-oxidasa*. D'altra banda, no s'han trobat flavonoides en la fracció **B**, sinó que tots els compostos són glucòsids i altres derivats d'àcids hidroxicinàmics, que actuen només com a captadors del radical $O_2^{\cdot-}$ en l'assaig de la XO. Aquesta fracció, però, ha demostrat ser la més activa en l'assaig de CL, el qual avalua la capacitat dels compostos de neutralitzar el radical $\cdot OH$, tot i que no és la més rica en compostos fenòlics, tal com mostren els resultats obtinguts de l'assaig de Folin-Ciocalteu. Aquest fet podria suggerir que l'estructura dels glucòsids i altres derivats dels àcids hidroxicinàmics és més adient que la dels flavonoides per la neutralització dels radicals $\cdot OH$, els radicals lliures més perillosos.

El fet que tots els flavonoides trobats en el lavandí tinguin les posicions 3' i 4' substituïdes per grups hidroxil (excepte el crisoeriol, que té un metilèter en lloc d'un hidroxil en la posició 3') formant un grup catecol, indica que es tracta de flavonoides amb marcada activitat antioxidant, ja que el grup catecol constitueix una característica estructural important pel desenvolupament d'aquesta activitat.

3.1.5.- Quantificació dels àcids clorogènic i rosmarínic

Els àcids clorogènic i rosmarínic estan regularment presents en les espècies de la família Lamiaceae, essent l'àcid rosmarínic el compost fenòlic dominant en aquesta família (Harborne & Williams, 2002; Shan *et al.*, 2005). Així, per la seva especial significança, es va procedir a la quantificació d'aquests dos derivats de l'àcid cafeic en el material de rebuig del lavandí, ja que no s'han trobat, fins al moment, referències ni d'identificació ni de quantificació d'aquests àcids en aquest material.

L'àcid clorogènic va resultar ser un dels principals compostos fenòlics del material de rebuig del lavandí, amb una concentració de 215 ± 6.8 mg / 100 g de pes sec. Comparant aquest contingut amb el d'altres espècies de plantes (*Taula 3.3*), pot observar-se que el material de rebuig del lavandí és particularment ric en aquest compost, només superat per *Coffea pseudozanguebariae*.

Material vegetal	mg /100 g DW	Referència
<i>Coffea pseudozanguebariae</i> Bridson	780	Bertrand <i>et al.</i> , 2003
Material de rebuig del lavandí	215	
<i>Foeniculum vulgare</i> L.	208	Parejo <i>et al.</i> , 2004b
<i>Prunus domestica</i> L.	123	Nakatani <i>et al.</i> , 2000
<i>Cynara scolymus</i> L.	15	Schütz <i>et al.</i> , 2004

Taula 3.3.- Contingut d'àcid clorogènic de diferent material vegetal (DW, pes sec)

D'altra banda, tot i que l'àcid rosmarínic és un dels principals compostos fenòlics de les espècies de la família Lamiaceae, la seva presència en el material de rebuig del lavandí ha resultat ser comparativament baixa en relació amb la d'altres espècies, amb una concentració de 124 ± 11.2 mg / 100 g de pes sec (Taula 3.4).

Material vegetal	mg /100 g DW	Referència
<i>Lepechinia graveolens</i> Willd.	2800	Parejo <i>et al.</i> , 2004a
<i>Origanum vulgare</i> L.	2562	Shan <i>et al.</i> , 2005
<i>Salvia officinalis</i> L.	2186	Shan <i>et al.</i> , 2005
<i>Mentha canadensis</i> L.	1908	Shan <i>et al.</i> , 2005
<i>Lavandula latifolia</i> L.	700	Lamaison <i>et al.</i> , 1990
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	550	Troncoso <i>et al.</i> , 2005
Material de rebuig del lavandí	124	

Taula 3.4.- Contingut d'àcid rosmarínic de diferent material vegetal (DW, pes sec)

3.2.- Tabac

3.2.1.- Identificació de compostos fenòlics per LC-MS/MS

Quan es varen analitzar les mostres de tabac de teixit jove (**TU**), senescent (**TD**), amb estrès hídric (**TE**) i control (**TC**) per LC-DAD, es van detectar, en totes les mostres, tres compostos amb un espectre UV que coincidia amb el de l'àcid clorogènic (àcid 3-*O*-cafeoilquínic) estàndard, fet que suggeria que els compostos fossin àcids cafeoilquínics, un d'ells el clorogènic i els altres dos, possibles isòmers. Les posteriors anàlisis per LC-MS/MS van confirmar que es tractava de derivats cafeoilquínics, i van permetre la determinació de la identitat de cada isòmer. A més, es van identificar temptativament quatre àcids

hidroxicinamoïlquínics més, set glucòsids d'àcids hidroxicinàmics, un glucòsid de l'àcid salicílic, dos flavonoides i tres conjugats de putrescina amb àcids hidroxicinàmics (HCAA). Els resultats de la identificació, junt amb els t_R i els trencaments obtinguts en els diferents experiments es mostren a la *Taula 3.5*.

Pic	Compost	t_R (min)	Mode	$[M - H]^-$ / $[M + H]^+$	Experiments MS/MS				DP(v) CE(v)
					Product ion scan (m/z)	Fragments (m/z (abundància relativa, %))	Neutral loss scan (u)	Precursor ion scan (m/z)	
1	Àcid 3- <i>O</i> -cafeoilquínic (àcid clorogènic)	22.99	-	353	353	119 (100), 173 (80), 179 (60), 191 (100)		191	-50 -20
2	Àcid 5- <i>O</i> -cafeoilquínic (àcid neoclorogènic)	25.52	-	353	353	179 (<5), 191 (100), 353 (10)		191	-50 -20
3	Àcid 4- <i>O</i> -cafeoilquínic (àcid criptoclorogènic)	29.60	-	353	353	173 (100), 179 (60), 191 (30), 353 (30)		191	-50 -20
4	Àcid 5- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroilquínic	30.09	-	337	337	173 (10), 191 (100), 337 (20)		191	-50 -20
5	Àcid 4- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroilquínic	33.60	-	337	337	163 (20), 173 (95), 191 (100), 337 (30)		191	-50 -20
6	Àcid 5- <i>O</i> -feruloilquínic	31.60	-	367	367	191 (100), 367 (20)		191	-50 -20
7	Àcid 4- <i>O</i> -feruloilquínic	34.46	-	367	367	173 (100), 367 (20)		191	-50 -20
8	Àcid cafeic- <i>O</i> -glucòsid 1	22.65	-	341	341	135 (100), 179 (80)	162	179	-60 -30
9	Àcid cafeic- <i>O</i> -glucòsid 2	24.84	-	341	341	135 (100), 179 (80)	162	179	-60 -30
10	Àcid cumàric- <i>O</i> -glucòsid	22.14	-	325	325	163 (100), 325 (20)	162	163	-50 -20
11	Àcid ferulic- <i>O</i> -glucòsid	25.13	-	355	355	193 (100), 355 (5)	162	193	-60 -30
12	Àcid salicílic- <i>O</i> -glucòsid	21.56	-	299	299	93 (30), 137 (100), 299 (10)	162		-30 -30
13	Àcid sinàpic- <i>O</i> -glucòsid 1	24.19	-	385	385	179 (<5), 223 (100)	162		-50 -20
14	Àcid sinàpic- <i>O</i> -glucòsid 2	27.03	-	385	385	153 (100), 179 (20), 223 (60)	162		-50 -20
15	Àcid trihidroxicinàmic- <i>O</i> - glucòsid	23.38	-	357	357	195 (100), 357 (10)	162		-50 -20
16	Kaempferol-7- <i>O</i> - neohesperidòsid	36.72	-	593	593	151 (<5), 285 (100), 327 (<5), 593 (30)	308	285	-60 -40
17	Rutina	34.90	-	609	285	133 (<5), 151 (<5), 285 (100)			-60 -40
18	Cafeoilputrescina	12.00	+	251	251	151 (10), 301 (100), 609 (80)	308	301	-60 -40
19	Cumaroilputrescina	13.38	+	235	235	89 (60), 163 (100), 234 (50), 251 (70)			20 20
20	Feruloilputrescina	12.31/ 16.45	+	265	265	89 (30), 147 (100), 218 (40), 235 (50)			20 20
	Taxifolina (<i>estàndard intern</i>)	30.45	-	303	303	89 (10), 177 (100), 248 (20), 265 (50)			20 20
						125 (30), 177 (30), 285 (100), 303 (20)			-50 -20

Taula 3.5.- Compostos fenòlics analitzats i identificats per LC-MS/MS en les mostres de tabac, amb el temps de retenció (t_R), el mode d'ionització (positiu o negatiu), i els fragments característics obtinguts en els diferents experiments MS/MS realitzats

3.2.1.1.- Àcids hidroxicinamoïlquínics

Els experiments de PIS i Prec van permetre la identificació dels tres àcids cafeoilquínics i la diferenciació entre els tres isòmers. Així, els compostos van ser identificats temptativament com a àcid 3-*O*-cafeoilquínic (àcid clorogènic) (compost **1**), àcid 5-*O*-cafeoilquínic (àcid neoclorogènic) (compost **2**), i àcid 4-*O*-cafeoilquínic (àcid criptoclorogènic) (compost **3**). Aquests àcids presenten un ió $[M - H]^-$ de m/z 353. La diferenciació entre els tres isòmers es va portar a terme segons la comparació de la intensitat relativa dels ions fragments resultants del PIS de l'ió m/z 353 a la mateixa intensitat de DP i CE, d'acord amb Clifford *et al.*, 2003. Així, l'àcid clorogènic va ser identificat per la presència d'un pic base de m/z 191, corresponent a la molècula d'àcid quínic desprotonada, i un pic secundari de m/z 179, corresponent a la molècula d'àcid cafeic desprotonada; l'àcid neoclorogènic només presentava un sol fragment de m/z 191; i l'àcid

criptoclorogènic un pic base característic de m/z 173, corresponent a la pèrdua d'un grup hidroxil de l'àcid quínic (Figura 3.4).

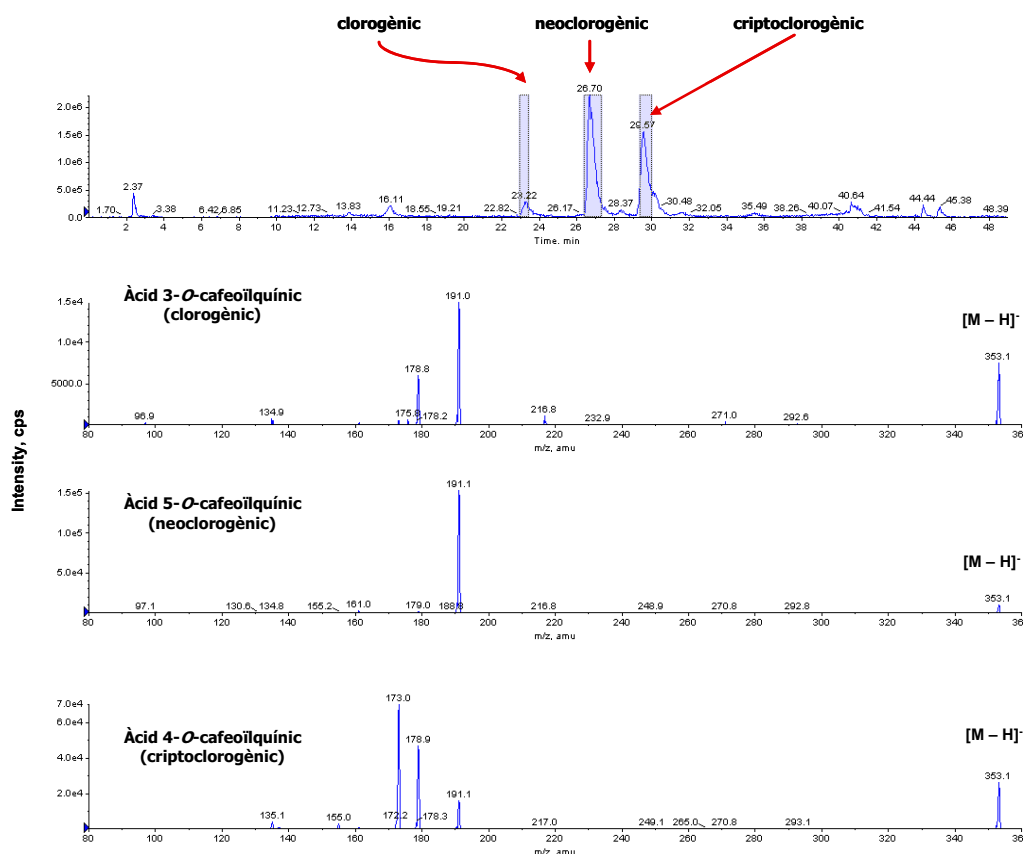


Figura 3.4.- Experiment de PIS del $[M - H]^-$ dels àcids cafeoilquínics (m/z 353). Diferenciació dels 3 isòmers per la diferent fragmentació per CID.

Els àcids cumaroilquínics van presentar un ió $[M - H]^-$ de m/z 337, i les seves identitats van ser assignades de la mateixa manera. El compost que va presentar un pic base de 191 m/z resultant del PIS de l'ió m/z 337, va ser identificat com a àcid 5-*O-p*-cumaroilquínic (compost **4**), mentre el compost amb un pic base de m/z 173 va correspondre a l'àcid 4-*O-p*-cumaroilquínic (compost **5**). Les identitats dels àcids feruloilquínics també es van assignar per la diferent intensitat relativa dels fragments resultants del PIS de l'ió $[M - H]^-$, que en el cas dels feruloilquínics va ser de m/z 367. El compost amb un ió fragment base de m/z 191 va ser identificat com a àcid 5-*O*-feruloilquínic (compost **6**), mentre que el que mostrava un ió base de m/z 173 va correspondre a l'àcid 4-*O*-feruloilquínic (compost **7**) (Clifford *et al.*, 2003). L'absència de senyals en el PIS de m/z 515 ($[M - H]^-$ de l'àcid dicafeoilquínic) i en els Prec dels ions de m/z 353, 337 i 367, va permetre descartar la presència d'àcids dihidroxicinamoilquínics (Clifford *et al.*, 2005).

3.2.1.2.- Glucòsids d'àcids benzoics i hidroxicinàmics

Experiments de NL de 162 u van posar de manifest la presència de dos glucòsids de l'àcid cafeic (compostos **8** i **9**), un glucòsid de l'àcid cumàric (compost **10**), un glucòsid de l'àcid ferúlic (compost **11**), dos glucòsids de l'àcid sinàpic (compostos **13** i **14**), i un glucòsid de l'àcid trihidroxicinàmic (compost **15**). Els corresponents experiments de PIS dels ions $[M - H]^-$ van confirmar les seves identitats. Així, els glucòsids de l'àcid cafeic van mostrar un ió $[M - H]^-$ de m/z 341, i els fragments de m/z 179 i 135 característics del trencament d'aquest àcid; el glucòsid de l'àcid cumàric, amb un ió $[M - H]^-$ de m/z 325, mostrava els ions fragments característics de m/z 163 i 119; el glucòsid de l'àcid ferúlic, amb un ió $[M - H]^-$ de m/z 355, mostrava els fragments característics de m/z 193, 178 i 149; i de la mateixa manera, els glucòsids de l'àcid sinàpic, amb un ió $[M - H]^-$ de m/z 385, mostraven els fragments característics de m/z 223 i 179. Els patrons de fragmentació d'aquests compostos es van correspondre amb els de la bibliografia (Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2004). El glucòsid de l'àcid trihidroxicinàmic també va ser temptativament identificat, mostrant un ió $[M - H]^-$ de m/z 357, i un ió fragment característic en el seu PIS de m/z 195.

Els experiments de NL de 162 u també van revelar l'existència d'un compost amb un ió $[M - H]^-$ de m/z 299. El seu PIS va mostrar dos fragments de m/z 137 i 93. Aquest compost va ser identificat com a glucòsid de l'àcid salicílic (compost **12**) després de ser comparat un compost estàndard i amb dades bibliogràfiques (Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2004).

3.2.1.3.- Flavonoides

La injecció dels extractes al sistema LC-ESI-MS/MS amb experiments de PIS, Prec, i NL de 308 u van mostrar la presència de dos flavonoides, el kaempferol-7-*O*-neohesperidòsid (compost **16**), i la rutina (quercetina-3-*O*-rutinòsid) (compost **17**). La rutina va mostrar un ió $[M - H]^-$ de m/z 609, i l'ió característic de la quercetina de m/z 301 després del seu PIS. El kaempferol-7-*O*-neohesperidòsid, amb un ió $[M - H]^-$ de m/z 593, va mostrar els ions fragments característics de m/z 327, 285 i 151 després del seu PIS. Els rutinòsids i neohesperidòsids de flavonoide presenten la mateixa massa molecular per una mateixa aglicona, i només es diferencien per la posició del sucre com a substituent i en el tipus d'enllaç interglucosídic entre els dos monosacàrids. Els experiments de PIS, però, permeten la diferenciació entre un rutinòsid i un neohesperidòsid, ja que les intensitats relatives dels diferents fragments resultants són diferents: els neohesperidòsids resulten més fragmentats que els rutinòsids. Així, les identitats dels compostos **16** i **17** van ser confirmades per la

seva coincidència amb compostos estàndard i amb dades bibliogràfiques (Cuyckens *et al.*, 2001; Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2003a).

La presència de rutina en el tabac ja s'havia descrit anteriorment (Li *et al.*, 2003), però fins ara, no s'havien trobat referències de la presència de kaempferol-7-*O*-neohesperidòsid al tabac.

3.2.1.4.- Amides d'àcids hidroxicinàmics (HCAA)

Les HCAA han estat tradicionalment detectades i identificades mitjançant tècniques de HPLC amb detecció de fluorescència. Les mostres on s'havien detectat aquests compostos procedien de les parts florals de plantes, com ara pol·len o pistils, on les HCAA hi estaven en una concentració molt alta. Aquests compostos, a més, es consideraven marcadors filogenètics, ja que hi havia espècies en que hi eren absents. Aquest fet, però, no era realment cert, ja que les HCAA són compostos presents en totes les plantes, i necessàries pel seu correcte funcionament. La manca de detecció era, doncs, conseqüència de la poca concentració en que es trobaven a la planta i de la baixa sensibilitat de les tècniques utilitzades. La concentració, però, també depèn de l'òrgan analitzat, de la fase de desenvolupament, de l'edat, de la situació ambiental, etc (Meurer *et al.*, 1988; Leubner-Metzger & Amrhein, 1993; Panagabko *et al.*, 2000).

Posteriorment es va començar a utilitzar la MS per a una identificació més acurada. Tot i així, la informació proporcionada era només de la massa molecular del compost, i es seguien analitzant mostres amb concentracions elevades de HCAA (Bokern *et al.*, 1995; Werner *et al.*, 1995; Hedberg *et al.*, 1996). Més endavant, la MS/MS comença a definir els trencaments d'aquestes molècules. Així, es van analitzar compostos estàndard de cumaroïlespermidina, feruloïlespermidina (sintetitzada per *hidroxicinamoïl-transferases* extretes de calls de tabac), diferents derivats d'espermidina (extrets de pol·len de *Quercus dentata*), i cumaroïlputrescina (extreta de toxines d'aranyes) (Negrel *et al.*, 1991; Bigler & Hesse, 1995; Hu *et al.*, 1996; Nimtz *et al.*, 1996). Finalment, es va posar en pràctica la tècnica de LC-MS/MS per l'anàlisi d'aquests compostos en mostres complexes, sense la necessitat de passos previs de purificació i concentració. Aquesta estratègia va permetre la detecció d'aquests compostos en altres localitzacions i espècies vegetals on les anteriors tècniques no havien tingut èxit degut a la baixa especificitat i/o sensibilitat. Així, s'ha aconseguit detectar cafeoïlputrescina i dicafeoïlputrescina en plantes de tabac amb deficiència de bor; cafeoïlputrescina en plantes de tabac transgèniques amb *invertases* derivades de llevats; diferuloïlputrescina i *p*-cumaroïlferuloïlputrescina en extractes lipídics de grans de blat de moro; i cumaroïlputrescina, feruloïlputrescina, cumaroïlagmatina i

feruloïlagmatina en arrels de civada (Peipp *et al.*, 1997; Baumert *et al.*, 2001; Moreau *et al.*, 2001; Camacho-Cristóbal *et al.*, 2004).

En el present treball es va optar per aquesta estratègia de LC-MS/MS per la identificació de HCAA, tant en el tabac com en l'*Arabidopsis thaliana*.

Per la detecció de les HCAA en les anàlisis de LC-MS/MS es va utilitzar el mode positiu, degut a la fàcil protonació dels grups amino en medi àcid.

La cafeoïlputrescina (compost **18**) va identificar-se al tabac mitjançant experiments de PIS de l'ió corresponent a la molècula protonada $[M + H]^+$ (m/z 251), mostrant els ions fragments característics de m/z 163 i 89 (*Figura 3.5*). Aquest patró de trencament, juntament amb el t_R , van coincidir amb els del compost estàndard, i amb les dades bibliogràfiques (Chen *et al.*, 2006).

Per tal d'identificar altres HCAA, es van injectar els extractes en mode MRM, el més sensible en un instrument de triple quadrupol. Mitjançant experiments de MRM programats de diferents combinacions d'àcids hidroxicinàmics amb poliamines, es van identificar temptativament dos derivats més de putrescina, la cumaroïlputrescina (compost **19**), i la feruloïlputrescina (compost **20**), que corresponien a les parelles d'ions de m/z 235/147 i 265/177 respectivament, essent el primer nombre l'ió $[M + H]^+$ i el segon, l'ió $[M - \text{putrescina} + H]^+$. Aquests trencaments, junt amb els t_R , es corresponien amb els de compostos estàndard, tot i que no es van poder confirmar per experiments de PIS degut a la poca concentració a la qual es trobaven a la mostra, ja que el mode PIS presenta una sensibilitat inferior al MRM. No es varen detectar derivats d'espermidina i espermina, ja que els resultats de MRM de parelles d'ions corresponents als trencaments de diferents conjugats d'àcids hidroxicinàmics amb espermidina o espermina van donar negatiu.

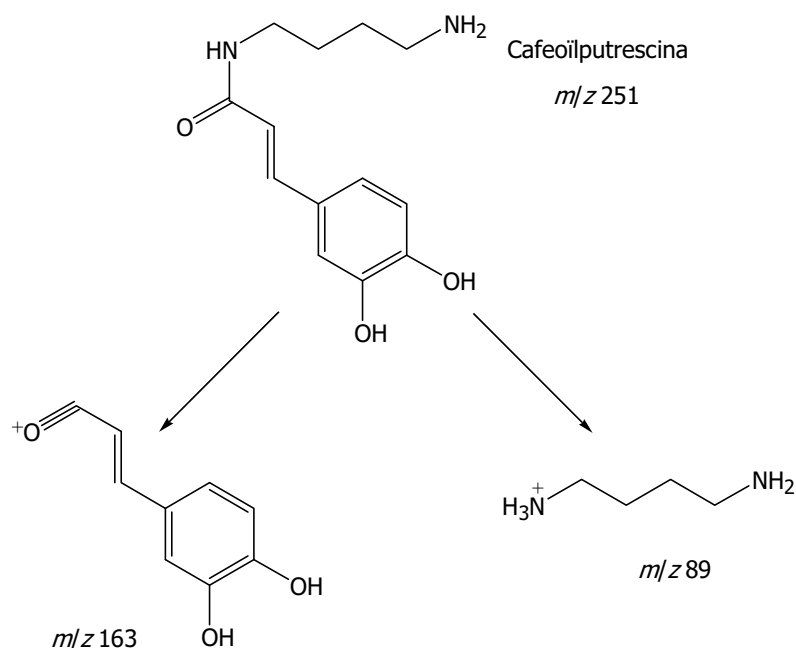


Figura 3.5.- Fragmentació per CID de la cafeoilputrescina

3.2.2.- Quantificació dels derivats d'àcids benzoics i hidroxicinàmics, dels flavonoides, i de les amides d'àcids hidroxicinàmics (HCAA)

Els derivats hidroxicinamoilquínics, els glucòsids d'àcids benzoics i hidroxicinàmics, i els flavonoides van ser quantificats per normalització interna, utilitzant taxifolina com a estàndard intern. Les unitats d'àrea relativa resultants en les diferents mostres (**TU**, **TD**, **TC**, i **TE**) es resumeixen a la *Taula 3.6*. Per la seva important presència en el tabac, l'àcid neoclorogènic i la rutina van ser quantificats per HPLC-DAD utilitzant una corba de calibratge amb compostos estàndard. Els continguts resultants es corresponen amb els obtinguts de la normalització interna, i es resumeixen en la *Taula 3.7*. Les HCAA identificades van ser quantificades amb una corba de calibratge utilitzant compostos estàndard i el mode de MRM de LC-MS/MS, ja que aquest és el mètode més sensible, i les concentracions d'aquests compostos no eren prou elevades perquè fossin detectades per HPLC-DAD. Els valors obtinguts es resumeixen a la *Taula 3.8*.

	Compost	TU	TD	TC	TE
<i>Derivats d'àcids benzoics i hidroxicinàmics i flavonoides</i>					
1	Àcid 3- <i>O</i> -cafeoilquínic (àcid clorogènic)	9.00 ± 0.42	385.80 ± 26.94	20.85 ± 5.16	87.70 ± 10.24
2	Àcid 5- <i>O</i> -cafeoilquínic (àcid neoclorogènic)	397.33 ± 41.49	9736.76 ± 764.84	233.4 ± 92.94	434.33 ± 44.15
3	Àcid 4- <i>O</i> -cafeoilquínic (àcid criptoclorogènic)	110.83 ± 25.01	772.66 ± 35.13	41.82 ± 9.10	136.33 ± 9.93
4	Àcid 5- <i>O-p</i> -cumaroilquínic	17.30 ± 2.26	30.77 ± 3.43	1.19 ± 0.24	1.39 ± 0.16
5	Àcid 4- <i>O-p</i> -cumaroilquínic	21.70 ± 1.45	22.06 ± 3.66	2.46 ± 0.45	3.41 ± 0.39
6	Àcid 5- <i>O</i> -feruloilquínic	23.83 ± 2.14	80.50 ± 4.19	5.38 ± 0.87	9.38 ± 0.68
7	Àcid 4- <i>O</i> -feruloilquínic	9.09 ± 1.51	17.21 ± 1.83	2.35 ± 0.46	5.00 ± 0.47
8	Àcid cafeic <i>O</i> -glucòsid 1	10.31 ± 1.65	16.92 ± 0.80	0.56 ± 0.07	1.22 ± 0.35
9	Àcid cafeic <i>O</i> -glucòsid 2	3.50 ± 0.34	9.12 ± 2.26	0.51 ± 0.04	1.35 ± 0.17
10	Àcid cumàric <i>O</i> -glucòsid	11.81 ± 3.45	77.51 ± 17.51	0.75 ± 0.13	1.23 ± 0.14
11	Àcid ferúlic <i>O</i> -glucòsid	8.69 ± 0.56	97.49 ± 11.99	4.17 ± 0.79	9.38 ± 0.95
12	Àcid salicílic <i>O</i> -glucòsid	0.06 ± 0.01	12.35 ± 2.65	-	-
13	Àcid sinàpic <i>O</i> -glucòsid 1	18.20 ± 5.46	100.99 ± 12.18	0.77 ± 0.11	3.84 ± 0.49
14	Àcid sinàpic <i>O</i> -glucòsid 2	28.50 ± 3.18	148.37 ± 28.22	4.42 ± 0.57	14.55 ± 0.42
15	Àcid trihidroxicinàmic <i>O</i> - glucòsid	10.39 ± 0.76	10.43 ± 1.39	0.22 ± 0.04	0.50 ± 0.09
16	Kaempferol-7- <i>O</i> - neohesperidòsid	35.75 ± 0.64	940.31 ± 170.06	5.01 ± 0.57	10.00 ± 0.53
17	Rutina	33.23 ± 5.60	1744.44 ± 394.65	1.40 ± 0.28	3.19 ± 0.46

Taula 3.6.- Quantificació per normalització interna dels diferents derivats d'àcids benzoics i hidroxicinàmics i flavonoides (1-17). Valors expressats en unitats d'àrea relativa respecte la taxifolina (5ppm) ± SD. **TU**, mostra de fulles de tabac joves; **TD**, mostra de fulles de tabac senescents; **TC**, mostra control de fulles de tabac; **TE**, mostra de fulles de plantes de tabac sotmeses a estrès hídric

	Compost	TU	TD	TC	TE
2	Àcid 5- <i>O</i> -cafeoilquínic (àcid neoclorogènic)	200.20 ± 20.13	223.54 ± 11.38	70.44 ± 10.81	190.32 ± 20.32
17	Rutina	213.14 ± 50.46	1134.62 ± 140.31	93.64 ± 20.31	263.24 ± 20.51

Taula 3.7.- Quantificació per corba de calibratge de l'àcid neoclorogènic (2) i la rutina (17). Valors expressats en µg/g FW ± SD. FW, pes fresc.

	Compost	TU	TD	TC	TE
<i>Àmides d'àcids hidroxicinàmics (HCAA)</i>					
18	Cafeoilputrescina	2.75 ± 0.12	0.32 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.55 ± 0.10
19	Cumaroilputrescina	-	-	-	-
20	Feruloilputrescina	0.13 ± 0.01	-	-	-

Taula 3.8.- Quantificació per corba de calibratge de les HCAA (18-20). Valors expressats en µg/g FW ± SD. FW, pes fresc.

Es pot observar com, a excepció de les HCAA, hi ha una quantitat superior de compostos fenòlics en les fulles senescentes (**TD**) que en les joves (**TU**). Aquest fet corrobora l'acumulació de compostos fenòlics que es dona en la senescència descrita en la introducció del present treball (*apartat 1.1.4.1.1*). El fet que aquests metabòlits tinguin propietats antioxidants podria indicar un intent de la planta de contrarestar l'acumulació de ROS que es dona paral·lelament en la senescència. D'altra banda, els derivats d'àcids hidroxicinàmics conjugats amb poliamines tenen un comportament diferent, ja que, de la mateixa manera que en la bibliografia es parla d'una disminució de poliamines lliures durant la senescència (Chen & Kao, 1991; Hurng & Kao, 1993), en el present treball s'ha observat que les HCAA també disminueixen. Aquesta disminució podria explicar-se pel fet que aquests compostos són importants en la reproducció activa de les plantes i en la generació de teixit nou, activitats que no es donen en els teixits senescentes.

Contràriament al què està descrit en la bibliografia (Bate *et al.*, 1994; Howles *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 2001), l'àcid clorogènic no és el compost fenòlic majoritari en el tabac, sinó que és el seu isòmer, l'àcid neoclorogènic, ja que la seva quantitat supera en gran mesura la dels altres derivats hidroxicinamoïlquínics. Tot i així, l'àcid clorogènic va mostrar un increment superior al 40% en la seva concentració en la comparació del teixit jove amb el senescent. Els àcids cumaroïlquínics i feruloïlquínics van presentar molt poc increment en el teixit senescent, igual que els glucòsids d'àcids benzoics i hidroxicinàmics, amb l'excepció del glucòsid de l'àcid salicílic, el contingut del qual va incrementar enormement en les mostres **TD**. Aquest fenomen podria ser degut al fet que l'àcid salicílic juga un paper important com a factor de senyalització en el procés de la senescència (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Schenk *et al.*, 2005; Miao & Zentgraf, 2007). Al seu torn, la rutina també experimenta un important augment en les mostres **TD**.

Les mostres sotmeses a estrès hídric (**TE**) també van experimentar un increment en tots els compostos fenòlics, incloent les HCAA, en relació amb les mostres control (**TC**). Aquest increment podria ser degut a un intent de la planta per defensar-se de la gran quantitat de ROS que es generen en l'estrès hídric, tal com s'ha suggerit en el cas de la senescència. D'altra banda, s'ha vist que el nivell de lignines, així com l'activitat d'enzims responsables de la lignificació, disminueix en plantes sotmeses a estrès hídric, ja que la lignificació en la zona d'elongació foliar en absència de creixement podria comprometre la posterior recuperació del creixement després d'una rehidratació (Vincent *et al.*, 2005). Tenint en compte aquest fet, l'increment de compostos fenòlics (precursors de les lignines (*apartat 1.1.2.1*)) observat en la situació d'estrès hídric podria ser degut a aquesta disminució de la lignificació.

3.3.- *Arabidopsis thaliana*

3.3.1.- Identificació de compostos fenòlics per LC-MS/MS

En l'anàlisi per LC-MS/MS de les mostres d'*Arabidopsis* sotmeses a estrès hídric (AE), amb sobreexpressió del gen *ADC2* (ADC2) i control (AC) es van identificar diferents compostos fenòlics, que es resumeixen en la Taula 3.9. En les diferents mostres d'*Arabidopsis* analitzades (AC, AE i ADC2), no va detectar-se cap diferència a nivell qualitatiu, ja que es van identificar els mateixos compostos en els tres tipus de mostres.

Pic	Compost	t_R (min)	Mode	$[M - H]^- / [M + H]^+$	Experiments MS/MS				
					Product ion scan (m/z)	Fragments (m/z (abundància relativa, %))	Neutral loss scan (u)	Precursor ion scan (m/z)	DP(v) CE(v)
1	Sinapoïlmalat	19.38	-	339	339	165 (20), 223 (100), 339 (<5)			-60 -30
2	Àcid salicílic- <i>O</i> -glucòsid	21.51	-	299	299	93 (30), 137 (100), 299 (10)	162		-30 -30
3	Àcid sinàpic- <i>O</i> -glucòsid	22.03	-	385	385	179 (<5), 223 (100)	162		-50 -20
4	Kaempferol- <i>O</i> -hexòsid-diramnòsid	22.31	-	739	739	285 (20), 430 (40), 593 (100), 739 (20)	146, 162	285	-60 -40
5	Kaempferol- <i>O</i> -diramnòsid	26.37	-	577	577	133 (<5), 151 (<5), 285 (100), 577 (100)	146	285	-60 -30
6	Cafeoïlespermidina	9.37	+	308	308	146 (30), 163 (100), 291 (20), 308 (<5)		146, 163	-60 -40
7	Cumaroïlespermidina	9.80	+	292	292	146 (50), 147 (100), 275 (<5), 292 (70)		146	20 10

Taula 3.9.- Compostos fenòlics identificats per LC-MS/MS en les mostres d'*Arabidopsis*, amb el temps de retenció (t_R), el mode d'ionització (positiu o negatiu), i els fragments característics obtinguts en els diferents experiments MS/MS realitzats

En mode negatiu, l'espectre de masses va mostrar un ió de m/z 339, que podia correspondre al compost sinapoïlmalat. L'experiment de PIS de 339 va mostrar el fragment de m/z 223, característic de la fragmentació d'aquest compost. Per tant, el compost **1** va ser temptativament identificat com a sinapoïlmalat.

Experiments de NL de 162 u van revelar la presència d'un glucòsid d'àcid salicílic (compost **2**) i un glucòsid d'àcid sinàpic (compost **3**). Aquests compostos van presentar uns ions $[M - H]^-$ de m/z 299 i 385 respectivament. Els posteriors experiments de PIS d'aquests ions $[M - H]^-$ van confirmar les seves identitats. El glucòsid de l'àcid salicílic va mostrar un fragment de m/z 137, característic de l'ió $[M - H]^-$ de l'àcid salicílic, i l'ió m/z 93, característic de la fragmentació d'aquest àcid, per la pèrdua del grup àcid. El glucòsid de l'àcid sinàpic va ser identificat per la fragmentació característica d'aquest compost en l'experiment de PIS del seu ió $[M - H]^-$ de m/z 385, el qual va donar lloc als fragments de m/z 223 i 179.

Experiments de NL de 162 i 146 u van revelar la presència de dos derivats glicosilats de kaempferol (compostos **4** i **5**). Ambdós van donar positiu en el NL de 146 u (corresponent a la pèrdua d'una ramnosa), però només el compost **4** va donar positiu al NL de 162 u (corresponent a la pèrdua d'una glucosa o una galactosa). Posteriors experiments de PIS dels ions $[M - H]^-$ corresponents, i de Prec de líó m/z 285 van confirmar les seves identitats. Així, el compost **4** va ser identificat temptativament com a kaempferol-*O*-hexòsid-diramnòsid, ja que mostrava un ió $[M - H]^-$ de m/z 739, i una pèrdua de dues ramnoses i una hexosa; i el compost **5** com a kaempferol-*O*-diramnòsid, ja que mostrava un ió $[M - H]^-$ de 577 m/z , i només la pèrdua de dues ramnoses (Figura 3.6). Les dades obtingudes per LC-MS/MS no permeten assignar la posició de l'enllaç dels sucres, però segons la bibliografia, els compostos podrien ser kaempferol-3-*O*-ramnosilglucòsid-7-*O*-ramnòsid (compost **4**), i kaempferol-3,7-*O*-diramnòsid (compost **5**) (Stobiecki *et al.*, 2006).

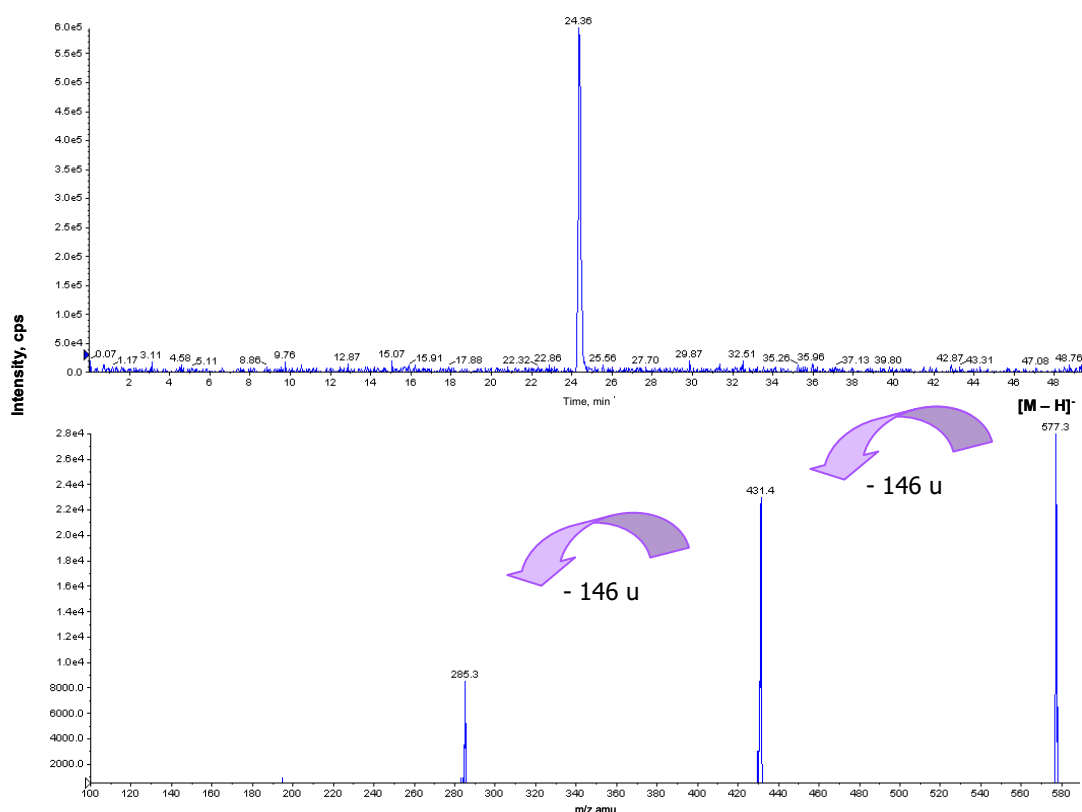


Figura 3.6.- Experiment de PIS de l'ió $[M - H]^-$ de m/z 577 (compost **5**). Els fragments resultants (431 i 285) corresponen a la pèrdua de dues ramnoses.

En mode positiu, l'espectre de masses va mostrar la presència d'un compost de força intensitat a un t_R de 9.37, i amb un ió $[M + H]^+$ de m/z 308 (compost **6**). Els experiments de PIS d'aquest ió van mostrar uns fragments de m/z 291, 163, i 146, característics del compost cafeoïlespermidina. El patró de fragmentació es va comparar amb

el del compost estàndard de feruloïlespermidina. Així, la identitat del compost **6** es va assignar temptativament com a cafeoïlespermidina. Les mostres van presentar un altre derivat d'espermidina (compost **7**), amb un ió $[M + H]^+$ de m/z 292, la identitat del qual (cumaroïlespermidina) també va ser confirmada per experiments de PIS de l'ió $[M + H]^+$ i Prec. Els trencaments corresponents a aquests compostos es mostren a la *Figura 3.7a* i *3.7b*. Segons la recerca bibliogràfica portada a terme, aquests compostos no s'havien identificat anteriorment en l'*Arabidopsis thaliana*.

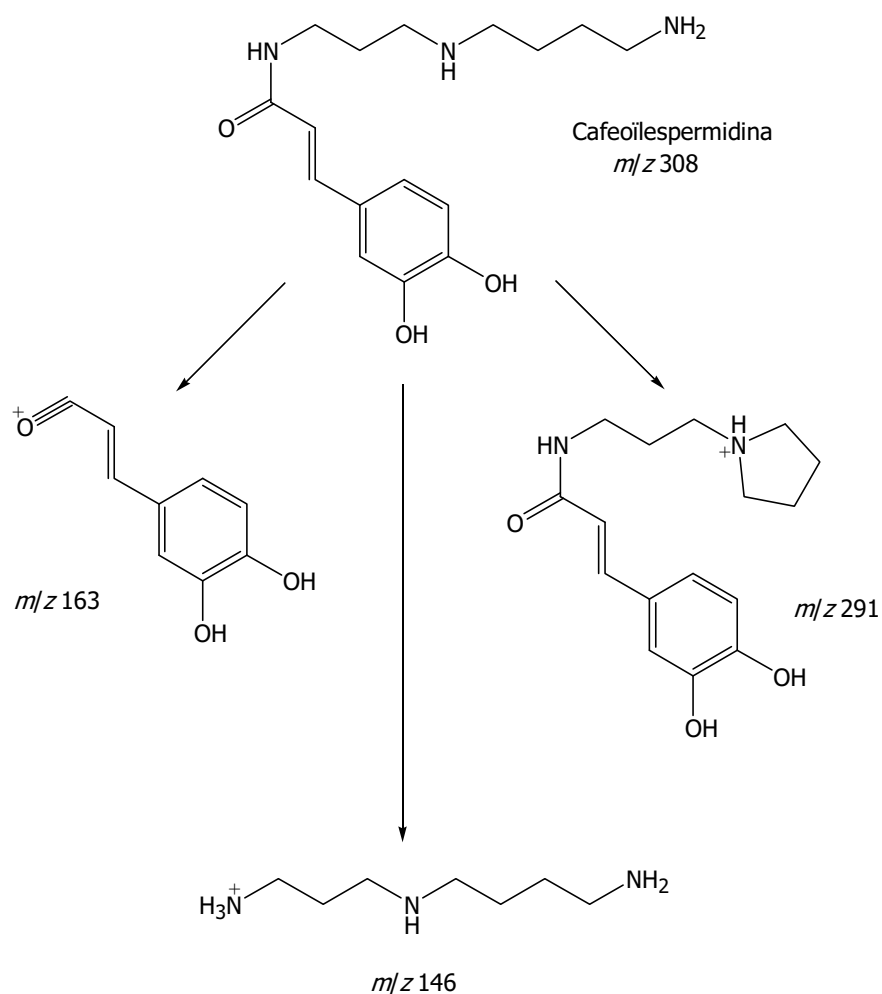


Figura 3.7a.- Fragmentació per CID de la cafeoïlespermidina en mode positiu (Hu *et al.*, 1996)

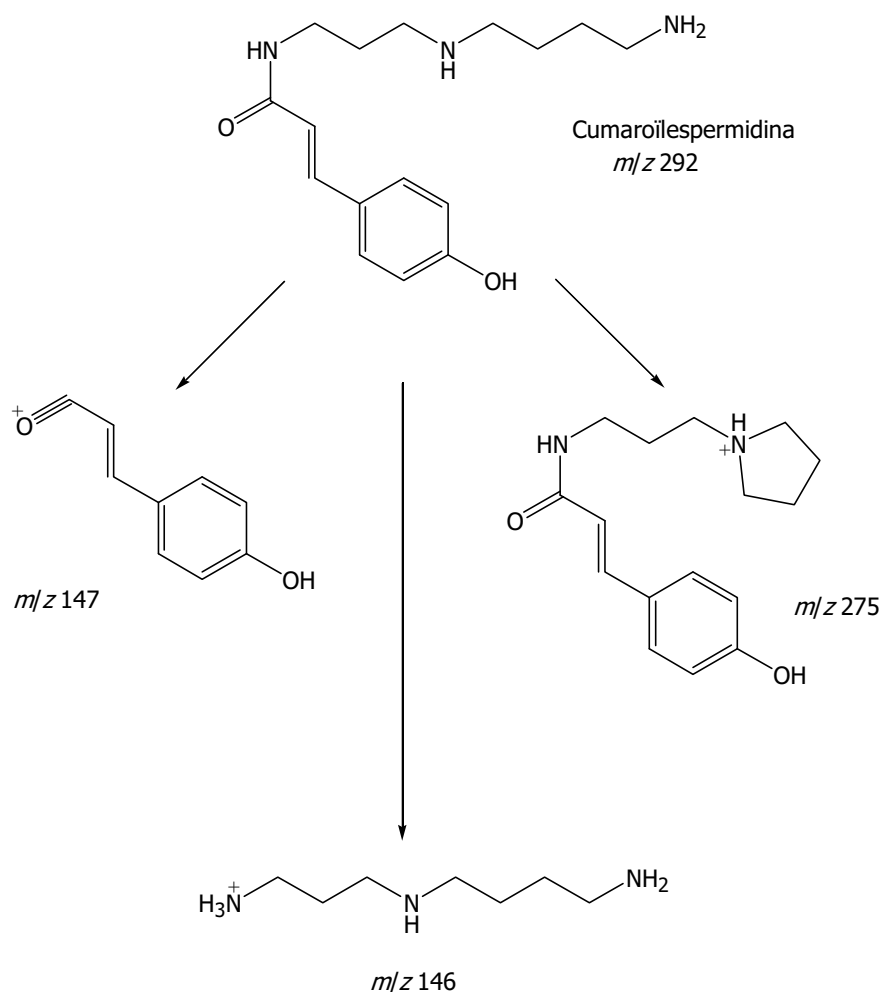


Figura 3.7b.- Fragmentació per CID de la cumaroïlespermidina en mode positiu (Hu *et al.*, 1996)

Tal com es va fer en el cas del tabac per comprovar la presència de derivats d'àcids hidròxicinàmics amb espermidina i espermina que no eren detectables per *Full scan* del LC-MS/MS, en l'*Arabidopsis* es varen programar diferents experiments MRM dels trencaments corresponents a diferents àcids hidroxicinàmics conjugats amb putrescina i espermina, i altres àcids hidroxicinàmics, diferents del cafeic i el cumàric, en combinació amb l'espermidina. El resultat va ser que no es van detectar HCAA derivades ni de putrescina ni d'espermina, apareixent només els derivats d'espermidina identificats prèviament (cafeoïlespermidina i cumaroïlespermidina).

Així doncs, segons les dades del present treball, sembla que, mentre que el tabac presenta HCAA de putrescina, l'*Arabidopsis* en presenta d'espermidina, i principalment cafeoïlespermidina.

3.4.- *Crinum humile*

3.4.1.- Identificació dels compostos aïllats CHU1 i CHU2 per tècniques de NMR i CD

3.4.1.1.- 7-Hidroxi-3',4'-metilendioxi-flavà (CHU1)

El compost **CHU1** va ser identificat com a 7-hidroxi-3',4'-metilendioxi-flavà (*Figura 3.8*) mitjançant de tècniques espectroscòpiques de NMR, IR i CD.

Les dades espectroscòpiques de NMR monodimensionals van suggerir que es podia tractar d'un flavà, per la presència d'un anell aromàtic en la posició 2, i l'absència d'una insaturació entre els carbonis 2 i 3. Les dades obtingudes dels experiments de NMR bidimensionals van permetre l'assignació completa de les dades espectrals de ^1H i ^{13}C , i es van comparar amb les proposades anteriorment per Ghosal *et al.* 1985b per aquest compost. Les dades obtingudes dels experiments de NMR es mostren a la *Taula 3.10*, mentre que els espectres es recullen en l'annex (*A1-A6*).

Les dades obtingudes de les tècniques de CI-GC-MS i IR van permetre la confirmació de l'estructura de la molècula (espectres *A7* i *A8* de l'annex respectivament).

L'espectre obtingut per la tècnica CD va mostrar un mínim al voltant de 300 nm, tal com mostra la *Figura 3.9*. Segons les dades bibliogràfiques, en una estructura de tipus flavà, aquest mínim correspon a la configuració absoluta *2S*, mentre que un màxim en aquesta zona hagués indicat la configuració *2R* (Slade *et al.*, 2005).

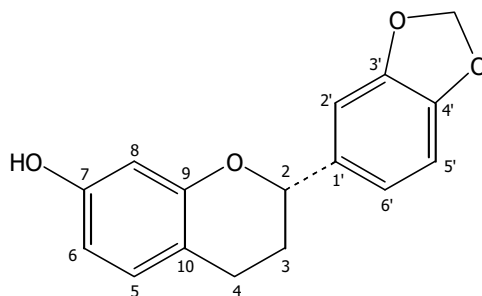


Figura 3.8.- Estructura de 7-hidroxi-3',4'-metilendioxi-flavà (**CHU1**)

Posició	H δ (J en Hz)	COSY	HSQC	HMBC
2	4.94 <i>dd</i> (2.5; 10.2)	H-3a	78.0 <i>d</i>	-
3a	2.02 <i>dddd</i> (5.2; 10.2; 11.2; 13.5)	H-2, H-3b, H-4a	24.7 <i>t</i>	-
3b	2.14 <i>dddd</i> (2.5; 3.4; 5.6; 13.5)	H-3a, H-4b	24.7 <i>t</i>	-
4a	2.72 <i>ddd</i> (3.4; 5.2; 16.0)	H-3a, H-4b	30.3 <i>t</i>	C-2; C-9; C-10
4b	2.89 <i>ddd</i> (5.6; 11.2; 16.0)	H-3b, H-4a	30.3 <i>t</i>	C-9; C-10
5	6.93 <i>d</i> (8.0)	H-6	108.4 <i>d</i>	C-9
6	6.39 <i>dd</i> (2.4; 8.0)	H-5	108.2 <i>d</i>	C-10
-	-	-	155.0 <i>s</i> (C-7)	
8	6.38 <i>d</i> (2.4)	-	103.7 <i>d</i>	C-9
-	-	-	156.0 <i>s</i> (C-9)	
-	-	-	114.4 <i>s</i> (C-10)	
-	-	-	135.8 <i>s</i> (C-1')	
2'	6.91 <i>d</i> (1.6)	H-6'	106.9 <i>d</i>	C-2; C-4'
-	-	-	148.0 <i>s</i> (C-3')	
-	-	-	147.4 <i>s</i> (C-4')	
5'	6.80 <i>d</i> (8.0)	H-6'	130.4 <i>d</i>	C-2; C-1'; C-3'
6'	6.86 <i>dd</i> (1.6; 8.0)	H-2', H-5'	119.8 <i>d</i>	C-2; C-2'; C-4'
OCH₂O	5.96 <i>s</i>	-	101.3 <i>t</i>	C-3'; C-4'

Taula 3.10.- Dades dels espectres de ¹H (H) amb el desplaçament químic (δ) en ppm, la multiplicitat, i les constants d'acoblament (J); de ¹³C (HSQC); i les correlacions COSY i HMBC de 7-hidroxi-3',4'-metilendioxi-flavà (**CHU1**)

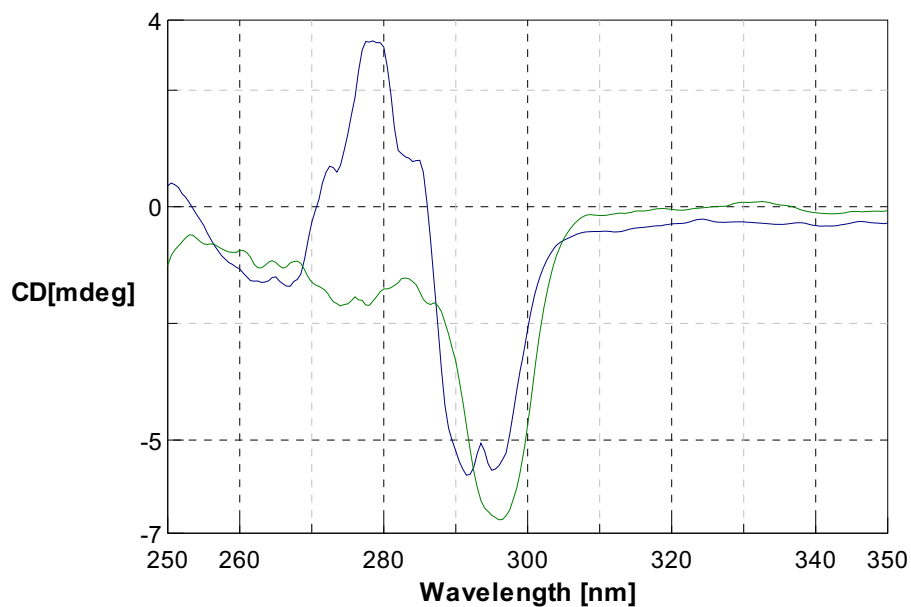


Figura 3.9.- Espectres de CD de 7-hidroxi-3',4'-metilendioxi-flavà (**CHU1**) (en verd) i 3-hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxi-flavà (**CHU2**) (en blau)

Segons la recerca bibliogràfica portada a terme, el compost 7-hidroxi-3',4'-metilendioxi-flavà, fins ara, només havia estat aïllat de l'espècie *Zephyranthes flava* Roem. & Schult. (Amaryllidaceae), espècie utilitzada tradicionalment pel tractament de la diabetis i algunes infeccions virals (Ghosal *et al.*, 1985b; Li *et al.*, 2001), i de *Knema laurina* Warb (Myristicaceae) (Gonzalez *et al.*, 1996).

3.4.1.2.- 3-Hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxi-flavà (CHU2)

El compost **CHU2** va ser identificat com a 3-hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxi-flavà, en base a les dades espectroscòpiques de NMR, confirmades per tècniques de GC-MS per CI, i IR. La configuració absoluta del flavà (2*R* i 3*S*) va ser determinada per CD, per comparació amb les dades bibliogràfiques (Slade *et al.*, 2005).

L'estructura de la molècula es mostra en la *Figura 3.10*, i l'espectre de CD en la *Figura 3.9*. L'assignació de l'estructura per les dades de NMR es mostren a la *Taula 3.11*. En l'annex es recullen els espectres de NMR (A9-A14), CI-GC-MS (A15), i IR (A16).

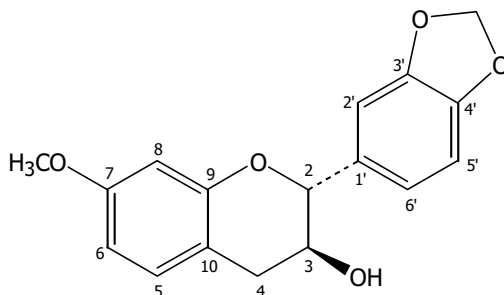


Figura 3.10.- Estructura de 3-hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxi-flavà (CHU2)

A diferència del compost anterior, aquesta estructura presenta un grup hidroxil en la posició 3, de manera que el protó de la posició 2 només acobla amb un protó de la posició 3. Aquest compost també presenta un grup metoxil que fa que aparegui un singlet a 3.78 ppm.

Posició	H δ (J in Hz)	COSY	HSQC	HMBC
2	4.99 <i>s</i>	H-3	78.8 <i>d</i>	C-2'
3	4.24 <i>br t</i> (3.5)	H-2, H-4a, H-4b	67.1 <i>d</i>	-
4a	2.90 <i>dd</i> (3.5; 16.4)	H-3, H-4b	33.1 <i>t</i>	C-2; C-3; C-5; C-9; C-10
4b	3.19 <i>dd</i> (3.5; 16.4)	H-3, H-4a	33.1 <i>t</i>	C-9; C-10
5	7.01 <i>br d</i> (8.4)	H-6	131.1 <i>d</i>	C-4; C-7; C-9
6	6.54 <i>dd</i> (2.8; 8.4)	H-5, H-8	108.8 <i>d</i>	C-10
	-	-	159.6 <i>s</i> (C-7)	
8	6.53 <i>br s</i> (2.8)	H-6	101.7 <i>d</i>	C-6; C-7; C-9; C-10
	-	-	154.9 <i>s</i> (C-9)	
	-	-	110.7 <i>s</i> (C-10)	
	-	-	132.3 <i>s</i> (C-1')	
2'	7.04 <i>d</i> (1.6)	H-6'	107.3 <i>d</i>	C-2; C-4'; C-6'
	-	-	148.2 <i>s</i> (C-3')	
	-	-	147.7 <i>s</i> (C-4')	
5'	6.86 <i>d</i> (8.0)	H-6'	108.6 <i>d</i>	C-1'; C-3'
6'	9.96 <i>dd</i> (1.6; 8.0)	H-2', H-5'	119.9 <i>d</i>	C-2; C-2'; C-4'
OCH₂O	5.98 <i>s</i>	-	101.4 <i>t</i>	C-3'; C-4'
OCH₃	3.78 <i>s</i>	-	55.6 <i>q</i>	C-7

Taula 3.11.- Dades dels espectres de ¹H (H) amb el desplaçament químic (δ) en ppm, la multiplicitat, i les constants d'acoblament (*J*); de ¹³C (HSQC); i les correlacions COSY i HMBC de 3-hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxi-flavà (CHU2)

Fins ara, aquest compost només havia estat aïllat i identificat en l'espècie *Hippeastrum ananuca* Phil. (Amaryllidaceae) mitjançant de dades cristal·logràfiques (Kimura *et al.*, 1979), però segons la recerca bibliogràfica realitzada, el present treball de tesi representaria la primera aportació de les dades de NMR, CD, IR i MS d'aquest compost.

3.4.2.- Presència de flavans en el gènere *Crinum*

Crinum, *Zephyranthes* i *Hippeastrum* constitueixen els únics gèneres de la família Amaryllidaceae en que s'han identificat flavans (Ghosal *et al.*, 1985b; Kimura *et al.*, 1979). Concretament, el 7-hidroxi-3',4'-metilendioxi-flavà i el 3-hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxi-flavà s'identifiquen per primera vegada en el gènere *Crinum* en el present treball. En la *Taula 3.12* es mostra un recull bibliogràfic dels flavans identificats fins al moment en l'esmentat gènere.

Flavà	Espècie	Referència
2(S),3',4'-Dihidroxi-7-metoxiflavà	<i>C. bulbispermum</i>	(Ramadan <i>et al.</i> , 2000)
(-)4'-Hidroxi-7-metoxi-8-metilflavà	<i>C. augustum</i>	(El-Hafiz & Ramadan, 1990)
4'-Hidroxi-7-metoxiflavà	<i>C. americanum</i>	(Ali <i>et al.</i> , 1988)
	<i>C. augustum</i>	(El Hafiz <i>et al.</i> , 1991)
	<i>C. bulbispermum</i>	(El Hafiz <i>et al.</i> , 1991)
	<i>C. moorei</i>	(Kamel, 1996)
	<i>C. asiaticum</i>	(Min <i>et al.</i> , 2001)
4'-Hidroxi-7-metoxiflavà-3-ol	<i>C. bulbispermum</i>	(Ramadan <i>et al.</i> , 2000)
4'-Hidroxi-7-metoxi-5'-metilflavà-3-ol	<i>C. americanum</i>	(Ali <i>et al.</i> , 1988)

Taula 3.12.- Flavans identificats en diferents espècies del gènere *Crinum* (Tram *et al.*, 2002).

3.5.- *Pancratium canariense*

3.5.1.- Identificació d'alcaloides de les Amaryllidaceae per GC-MS

En les fraccions resultants de la cromatografia de líquids al buit que contenien alcaloides dels extractes **EEA1** i **EEA2** de *Pancratium canariense* (*apartat 2.3.1*), es varen identificar un total de 25 alcaloides, cap dels quals, excepte la pancracina (Pérez de Paz & Hernández Padrón, 1999), havien estat identificats anteriorment en aquesta espècie. Els alcaloides van ser identificats per comparació dels seus espectres de masses amb els d'estàndards prèviament aïllats en altres espècies de la família Amaryllidaceae i identificats per NMR (compostos **1, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 18, 21, 22, 23** i **24**), amb dades bibliogràfiques (Ali *et al.*, 1986) (compost **2**) i amb la base de dades NIST 05 (compostos **7, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20** i **25**).

Els alcaloides identificats, juntament amb els seus fragments característics i la seva intensitat relativa es mostren en la *Taula 3.13*.

	Alcaloide	t _R (min)	RI	M ⁺	Fragments característics (m/z (intensitat relativa,%))
1	Hordeïna ^a	7.653	1469	165	58 (100)
2	Trisferidina ^b	19.048	2282	223	224 (15), 223 (100), 222 (40), 167 (8), 165 (9), 164 (14), 138 (20), 137 (9), 128 (10), 113 (16), 111 (13)
3	Galantamina ^a	20.980	2406	287	286 (100), 270(15), 256(2), 244(30), 230(15), 216(39), 174(37), 128(9), 115 (15)
4	N-Demetilgalantamina ^a	21.580	2443	273	274 (17), 173 (95), 272 (100), 242 (8), 230 (34), 228 (8), 202 (27), 201 (10), 181 (9), 174 (13), 128 (10), 115 (14)
5	Vitatina/Crinina ^a	21.998	2472	271	271 (100), 270 (15), 254 (14), 242 (9), 228 (25), 224 (10), 216 (11), 215 (10), 214 (18), 212 (11), 211 (11), 201 (18), 200 (28), 199 (95), 198 (13), 188 (19), 187 (85), 185 (18), 174 (13), 173 (28), 172 (21), 169 (10), 160 (18), 159 (10), 141 (13), 139 (12), 129 (26), 128 (32), 127 (18), 115 (33), 77 (14), 57 (15)
6	Narwedina ^a	22.173	2478	285	286 (14), 285 (83), 284 (100), 242 (19), 228 (10), 199 (18), 174 (30), 128 (13), 115 (13)
7	Anhidrolicorina ^c	22.450	2501	251	251 (43), 250 (100), 192 (12), 191 (11)
8	8-O-Demetilmartidina/ Macowina ^a	22.540	2510	273	274 (19), 273 (100), 272 (21), 256 (22), 254 (13), 244 (16), 230 (20), 228 (11), 226 (16), 216 (13), 211 (20), 203 (15), 202 (27), 201 (83), 190 (11), 189 (42), 188 (11), 175 (20), 174 (23), 173 (12), 157 (12), 147 (11), 131 (13), 129 (14), 128 (23), 117 (11), 116 (10), 115 (24), 91 (11), 57 (19), 56 (12)
9	Caranina ^c	22.790	2523	271	272 (10), 271 (56), 270 (33), 253 (10), 252 (45), 250 (11), 227 (44), 226 (100), 135 (9)
10	Acetilcaranina ^c	22.850	2526	313	314 (10), 313 (55), 254 (13), 253 (19), 252 (91), 250 (13), 227 (38), 226 (100)
11	Habrantina ^a	23.127	2548	303	303 (16), 302 (10), 231 (20), 230 (100), 213 (26), 187 (10), 174 (17), 152 (12), 141 (11), 128 (14), 115 (22), 77 (10)
12	Dihidrocaranina ^c	23.417	2562	273	273 (43), 272 (100), 254 (9), 176 (11), 175 (13), 147 (9)
13	Assoanina ^a	23.666	2580	267	268 (8), 267 (50), 266 (100), 250 (22), 222 (12), 180 (12)
14	Norpluviina ^c	23.870	2596	273	274 (11), 273 (68), 272 (41), 255 (10), 254 (45), 240 (9), 229 (45), 228 (100), 214 (13), 186 (10), 77 (12)
15	Hipamina (licorina 2-O-metilèter) ^c	24.020	2675	301	301 (16), 300 (11), 268 (10), 252 (12), 250 (21), 228 (12), 227 (82), 226 (100), 147 (18), 125 (16), 119 (12), 110 (10)
16	Pancracina ^c	25.301	2718	287	288 (18), 287 (100), 286 (23), 243 (20), 223 (22), 214 (15), 199 (22), 185 (30), 128 (11), 115 (13)
17	Galantina ^c	25.548	2720	317	317 (20), 316 (15), 298 (9), 284 (11), 268 (16), 244 (14), 243 (89), 242 (100), 162 (10)
18	Hamaina/ 11-Hidroxivitatina ^a	25.511	2699	287	259 (16), 258 (100), 211 (12), 187 (9), 186 (17), 181 (11), 153 (10), 129 (12), 128 (19), 115 (17)
19	Licorina ^a	26.046	2746	287	287 (31), 286 (19), 268 (24), 250 (15), 228 (14), 227 (79), 226 (100), 147 (15), 119 (12), 91 (14), 82 (10), 77 (11), 65 (15)
20	Dihidrolicorina ^c	25.911	2747	289	289 (37), 288 (100)
21	Incartina ^a	26.283	2761	333	334 (13), 333 (58), 332 (100), 296 (10), 260 (15), 259 (80), 258 (81), 244 (12)
22	N-Formilnorgalantamina ^a	26.983	2816	301	230(130), 226(11), 225(26), 223(11), 213(11), 212(12), 211(29), 200(11), 199(10), 197(12), 195(13), 193(12), 187(12), 185(11), 181(14), 169(10), 165 (13), 153(10), 152(10), 141(12), 128(17), 115(26)
23	Pseudolicorina ^a	27.231	2830	289	289 (22), 288 (16), 252 (12), 230 (11), 229 (69), 228 (100), 214 (10), 147 (17), 111 (18)
24	Hipeastrina ^a	28.185	2917	315	126 (8), 125 (100), 124 (9)
25	Narcissidina ^c	28.490	3420	333	333 (10), 332 (23), 316 (13), 315 (48), 314 (12), 284 (100), 266 (39), 259 (10), 258 (45), 242 (16), 241 (11), 231 (9), 230 (58), 229 (12), 228 (50), 214 (11), 189 (12), 162 (18), 151 (20), 147 (11), 91 (13), 80 (12), 77 (14), 53 (10)

Taula 3.13.- Alcaloides de les Amaryllidaceae identificats en *Pancreatium canariense* amb el temps de retenció (t_R), l'índex de retenció (RI), l'ió molecular M⁺ i els fragments característics amb la intensitat relativa.

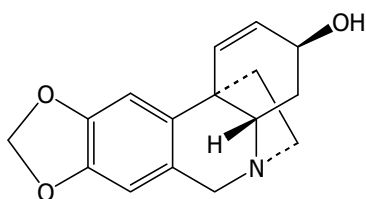
^a identificació per comparació de l'espectre de masses amb el d'estàndards aïllats

^b identificació per comparació de l'espectre de masses amb dades bibliogràfiques (Ali *et al.*, 1986)

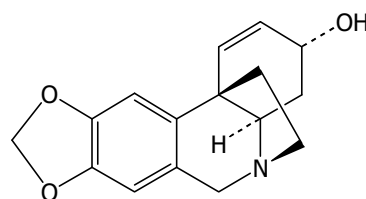
^c identificació per comparació de l'espectre de masses amb la base de dades NIST 05

La tècnica de GC-MS no permet la diferenciació entre dos estereoisòmers, ja que presenten la mateixa massa molecular i el mateix patró de fraccionament per EI. Aquest és el cas dels compostos **5**, **8**, i **18** (Figura 3.11). Per poder determinar de quin estereoisòmer es tracta (vitatina o crinina, 8-*O*-demetilmaritidina o macowina, i hamaina o 11-hidroxivitatina) cal la tècnica de CD, però per portar a terme aquestes anàlisis satisfactòriament és necessari que els compostos siguin aïllats i purificats, fet que no va ser possible degut a la baixa concentració en que es troben aquests compostos en l'espècie *Pancreatium canariense*.

Compost **5**

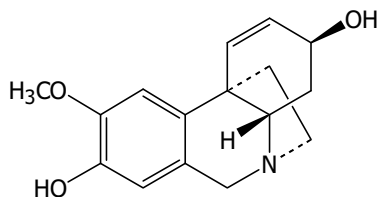


vitatina

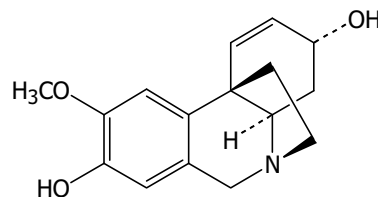


crinina

Compost **8**

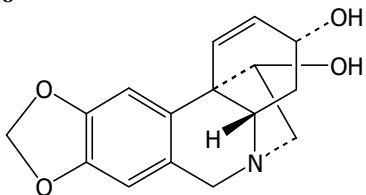


8-*O*-demetilmaritidina

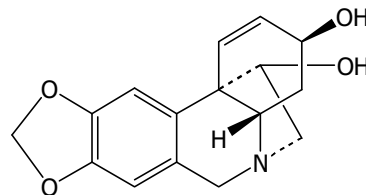


macowina

Compost **18**



hamaina



11-hidroxivitatina

Figura 3.11.- Estereoisòmers que poden presentar el mateix trencament per EI

Es va fer una recerca bibliogràfica sobre els alcaloides identificats en altres espècies del gènere *Pancratium*. La relació d'alcaloides junt amb la referència bibliogràfica corresponent es mostren en la *Taula 3.14*.

Alcaloide	Espècie	Referència
Acetillicoramina	<i>P. maritimum</i>	(Youssef, 1999)
Bufanisina	<i>P. maritimum</i>	(Sener <i>et al.</i> , 1994; Berkov <i>et al.</i> , 2004)
Crinà-3-ona	<i>P. maritimum</i>	(Berkov <i>et al.</i> , 2004)
Crinina	<i>P. maritimum</i>	(Sener <i>et al.</i> , 1994; Youssef, 1999; Berkov <i>et al.</i> , 2004)
<i>N</i> -Demetilgalantamina	<i>P. maritimum</i>	(Berkov <i>et al.</i> , 2004)
9- <i>O</i> -Demetilhomolicorina	<i>P. maritimum</i>	(Vázquez Tato <i>et al.</i> , 1998)
(-)- <i>N</i> -Demetillicoramina	<i>P. maritimum</i>	(Youssef, 1999)
Demetilmartidina	<i>P. maritimum</i>	(Berkov <i>et al.</i> , 2004)
(8-demetilmartidina)	<i>P. sickenbergeri</i>	(Abou-Donia <i>et al.</i> , 2002)
6 α -Deoxitazetina	<i>P. maritimum</i>	(Berkov <i>et al.</i> , 2004)
α -Dihidrocaranina	<i>P. maritimum</i>	(Berkov <i>et al.</i> , 2004)
Dihidrolicorina	<i>P. maritimum</i>	(Sandberg & Michel, 1968)
3-11-Dihidrox-1,2-dehidrocrinà	<i>P. maritimum</i>	(Sener <i>et al.</i> , 1994)
6-11-Dihidrox-3-metoxi-1,2-dehidrocrinà	<i>P. maritimum</i>	(Sener <i>et al.</i> , 1994)
<i>O,N</i> -Dimetilnorbellaína	<i>P. maritimum</i>	(Vázquez Tato <i>et al.</i> , 1998)
<i>N</i> -Formilnorgalantamina	<i>P. maritimum</i>	(Berkov <i>et al.</i> , 2004)
Galantamina	<i>P. illyricum</i>	(Boit & Ehmke, 1957)
	<i>P. arabicum</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1964)
	<i>P. tortuosum</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1964)
	<i>P. trianthum</i>	(Dabire & Muravjova, 1983)
	<i>P. maritimum</i>	(Vázquez Tato <i>et al.</i> , 1998; Berkov <i>et al.</i> , 2004)
4- <i>O</i> - β -D-Glucopiranosilnarciclasina	<i>P. maritimum</i>	(Abou-Donia <i>et al.</i> , 1991)
Gracilina	<i>P. maritimum</i>	(Berkov <i>et al.</i> , 2004)
Habrantina	<i>P. maritimum</i>	(Vázquez Tato <i>et al.</i> , 1998)
Hemantamina	<i>P. maritimum</i>	(Sandberg & Michel, 1968; Sener <i>et al.</i> , 1994; Vázquez Tato <i>et al.</i> , 1998; Berkov <i>et al.</i> , 2004)
	<i>P. sickenbergeri</i>	(Abou-Donia <i>et al.</i> , 2002)
Hemantidina	<i>P. arabicum</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1964)
	<i>P. tortuosum</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1964)
	<i>P. trianthum</i>	(Dabire & Muravjova, 1983)
	<i>P. maritimum</i>	(Vázquez Tato <i>et al.</i> , 1998)
	<i>P. sickenbergeri</i>	(Abou-Donia <i>et al.</i> , 2002)
6-hidroxibufanisina	<i>P. sickenbergeri</i>	(Abou-Donia <i>et al.</i> , 2002)
(-)-8-Hidrox-9-metoxicrinina	<i>P. maritimum</i>	(Sener <i>et al.</i> , 1994)

Hipadina	<i>P. maritimum</i>	(Hoshino, 1998)
Hipeastrina	<i>P. trianthum</i>	(Dabire & Muravjova, 1983)
	<i>P. maritimum</i>	(Vázquez Tato <i>et al.</i> , 1998)
Homolicorina	<i>P. maritimum</i>	(Hoshino, 1998)
8-Hidroxi-9-metoxicrinina	<i>P. maritimum</i>	(Hoshino, 1998)
11-Hidroxivitatina	<i>P. maritimum</i>	(Vázquez Tato <i>et al.</i> , 1998)
	<i>P. sickenbergeri</i>	(Abou-Donia <i>et al.</i> , 2002)
Licoramina	<i>P. maritimum</i>	(Youssef & Frahm, 1998)
Licorenina	<i>P. arabicum</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1964)
	<i>P. maritimum</i>	(Hoshino, 1998)
Licorina	<i>P. sickenbergeri</i>	(Sharaf <i>et al.</i> , 1960; Abou-Donia <i>et al.</i> , 2002)
	<i>P. arabicum</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1964)
	<i>P. tortuosum</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1964)
	<i>P. triflorum</i>	(Rao & Devi, 1965)
	<i>P. longiflorum</i>	(Rangaswami & Rao, 1966)
	<i>P. trianthum</i>	(Dabire & Muravjova, 1983)
	<i>P. biflorum</i>	(Ghosal <i>et al.</i> , 1984)
	<i>P. maritimum</i>	(Vázquez Tato <i>et al.</i> , 1998; Berkov <i>et al.</i> , 2004)
Licorina-1- <i>O</i> -β-D-glucòsid	<i>P. biflorum</i>	(Ghosal <i>et al.</i> , 1984)
Maritidina	<i>P. maritimum</i>	(Youssef & Frahm, 1998)
6- <i>O</i> -Metilhemantidina	<i>P. maritimum</i>	(Vázquez Tato <i>et al.</i> , 1998)
Neronine	<i>P. longiflorum</i>	(Rangaswami & Rao, 1966)
Norgalantamina	<i>P. sickenbergeri</i>	(Abou-Donia <i>et al.</i> , 2002)
Norneronine	<i>P. longiflorum</i>	(Rangaswami & Rao, 1966)
Norpluviina	<i>P. maritimum</i>	(Sandberg & Michel, 1968)
Pancracina	<i>P. maritimum</i>	(Hoshino, 1998; Berkov <i>et al.</i> , 2004)
	<i>P. sickenbergeri</i>	(Abou-Donia <i>et al.</i> , 2002)
Pancreatistatina	<i>P. littorale</i>	(Pettit <i>et al.</i> , 1984)
	<i>P. maritimum</i>	(Youssef, 2003)
Pancritamina	<i>P. maritimum</i>	(Youssef, 1999)
Pretazetina	<i>P. biflorum</i>	(Ghosal <i>et al.</i> , 1984)
Pseudolicorina	<i>P. biflorum</i>	(Ghosal <i>et al.</i> , 1984)
	<i>P. maritimum</i>	(Hoshino, 1998)
Pseudolicorina-1- <i>O</i> -β-D-glucòsid	<i>P. biflorum</i>	(Ghosal <i>et al.</i> , 1984)
Sickernbergina	<i>P. arabicum</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1964)
	<i>P. tortuosum</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1964)
	<i>P. maritimum</i>	(Hoshino, 1998)
Tazetina	<i>P. arabicum</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1964)
	<i>P. tortuosum</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1964)
	<i>P. trianthum</i>	(Dabire & Muravjova, 1983)

	<i>P. biflorum</i>	(Ghosal <i>et al.</i> , 1984)
	<i>P. maritimum</i>	(Berkov <i>et al.</i> , 2004)
Trisferidina	<i>P. trianthum</i>	(Dabire & Muravjova, 1983)
	<i>P. maritimum</i>	(Hoshino, 1998; Berkov <i>et al.</i> , 2004)
Ungeremina	<i>P. maritimum</i>	(Hoshino, 1998)
Ungiminorina	<i>P. maritimum</i>	(Vázquez Tato <i>et al.</i> , 1998)
Ungiminorina- <i>N</i> -òxid	<i>P. maritimum</i>	(Vázquez Tato <i>et al.</i> , 1998)
Vitatina	<i>P. tortuosum</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1964)
	<i>P. maritimum</i>	(Vázquez Tato <i>et al.</i> , 1998)
	<i>P. sickenbergeri</i>	(Abou-Donia <i>et al.</i> , 2002)
Zefbetaïna	<i>P. maritimum</i>	(Hoshino, 1998)

Taula 3.14.- Alcaloides de les Amaryllidaceae identificats en diferents espècies del gènere *Pancreatum*

Després de contrastar els resultats de la recerca amb els alcaloides identificats en l'espècie *P. canariense*, es va determinar que dels 25 alcaloides identificats, 10 eren inèdits en el gènere *Pancreatum*. Aquests 10 són l'acetilcaranina, l'anhidrolicorina, l'assoanina, la caranina, la galantina, l'hipamina, l'hordenina, l'incartina, la narcissidina, i la narwedina.

Si bé en cada secció d'aquesta memòria ja s'han exposat les conclusions extretes dels diferents treballs desenvolupats, a continuació s'exposen les més rellevants de cadascun d'ells:

- L'estudi dels compostos fenòlics del material de rebuig del lavandí ha permès determinar la seva composició fenòlica i la seva correlació amb l'activitat antioxidant, de manera que aquest material podria constituir una nova font d'obtenció de compostos antioxidants d'origen vegetal, i de fàcil accés, fet que implicaria, a més, el reciclatge d'aquest material després de la destil·lació dels olis essencials.
- L'important paper dels compostos fenòlics en els processos de senescència i estrès hídric es fa palès en plantes de tabac, en que, particularment els derivats d'àcids benzoics i hidroxicinàmics, i flavonoides, augmenten considerablement en els teixits senescents, però no els conjugats d'àcids hidroxicinàmics amb poliamines, que disminueixen. Tots els compostos fenòlics, però, augmenten en plantes sotmeses a estrès hídric respecte les plantes control.
- Les amides d'àcids hidroxicinàmics principals en les plantes de tabac són derivades de putrescina (cafeoïlputrescina, cumaroïlputrescina i feruloïlputrescina), mentre que les d'*Arabidopsis thaliana* són derivades d'espermidina (cafeoïlespermidina i cumaroïlespermidina).
- L'estructura de dos flavans (7-hidroxi-3',4'-metilendioxi-flavà i 3-hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxi-flavà) extrets de l'espècie *Crinum humile* ha estat determinada. Ambdós compostos s'han identificat per primera vegada en el gènere *Crinum*, i s'aporten, per primer cop, les dades espectroscòpiques de NMR de 3-hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxi-flavà.
- Una sèrie de 25 alcaloides de les Amaryllidaceae han estat identificats en l'espècie *Pancratium canariense*, 10 dels quals són inèdits en el gènere *Pancratium*.

Així doncs, es pot afirmar que, de manera global, els mètodes i tècniques proposats com a eines per l'estudi metabòlic han resultat efectius per la consecució dels diferents objectius, aprofitant i adaptant les característiques i avantatges de cadascuna, a les necessitats i requeriments de cada objectiu.

- Abian J. (1999). The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **34**: 157-168.
- Abou-Donia A. H., De Giulio A., Evidente A., Gaber M., Habib A., Lanzetta R., Seif El Din A. A. (1991). Narciclasine-4-*O*- β -D-glucopyranoside, a glucosyloxy amidic phenanthridone derivative from *Pancratium maritimum*. *Phytochemistry* **30**: 3445-3448.
- Abou-Donia A. H., Amer M. E., Darwish F. A., Kassem F. F., Hammouda H. M., Abdel-Kader M. S., Zhou B., Kingston D. G. I. (2002). Two new alkaloids of the crinine series from *Pancratium sickenbergeri*. *Planta Medica* **68**: 379-381.
- Abuja P. M., Albertini R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidative resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* **306**: 1-17.
- Ahmed Z. F., Rize A. M., Hamouda F. M. (1964). Egyptian *Pancratium* species. *Lloydia* **27**: 115-134.
- Alcázar R., García-Martínez J. L., Cuevas J. C., Tiburcio A. F., Altabella T. (2005). Overexpression of *ADC2* in *Arabidopsis* induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *The Plant Journal* **43**: 425-436.
- Alcázar R., Cuevas J. C., Patrón M., Altabella T., Tiburcio A. F. (2006a). Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **128**: 448-455.
- Alcázar R., Marco F., Cuevas J. C., Patrón M., Ferrando A., Carrasco P., Tiburcio A. F., Altabella T. (2006b). Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters* **28**: 1867-1876.
- Ali A. A., El Sayed H. M., Abdallah O. M., Steglich W. (1986). Oxocrinine and other alkaloids from *Crinum americanum*. *Phytochemistry* **25**: 2399-2401.
- Ali A. A., Sayed H. M., Abdalla O. M., Steglich W. (1988). Flavans from *Crinum americanum*. *Die Pharmazie* **43**: 295-296.
- Alscher R. G., Donahue J. L., Cramer C. L. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* **100**: 224-233.
- Al-Shehbaz I. A., O'Kane Jr. S. L. (2002). Taxonomy and phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). In: Somerville C. R., Meyerowitz E. M. Ed. *The Arabidopsis Book*. Rockville: American Society of Plant Physiologists.

- Álvarez M. E., Pennell R. I., Meijer P., Ishikawa A., Dixon R. A., Lamb C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**: 773-784.
- Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* **127**: 183-198.
- Apel K., Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399.
- Areias F. M., Valentão P., Andrade P. B., Moreira M. M., Amaral J., Seabra R. M. (2000). HPLC/DAD analysis of phenolic compounds from lavender and its application to quality control. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **23**: 2563-2572.
- Arnao M., Cano A., Acosta M. (1999). Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radical Research* **31**: 89-96.
- Aruoma O. I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* **32**: 671-683.
- Aruoma O. I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research* **523-524**: 9-20.
- Asada K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 601-639.
- Austin M. B., Noel J. P. (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports* **20**: 79-110.
- Ayabe S., Akashi T. (2006). Cytochrome P450s in flavonoid metabolism. *Phytochemistry Reviews* **5**: 271-282.
- Azzi A., Stocker A. (2000). Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research* **39**: 231-255.
- Bartel B., Matsuda S. P. T. (2003). Seeing red. *Science* **299**: 352-353.
- Bastida J., Viladomat F. (2002). Alkaloids of *Narcissus*. In: Hanks G. Ed. *Narcissus and Daffodil, The Genus Narcissus*. London and New York: Taylor & Francis, Vol 21, 141-214.
- Bastida J., Lavilla R., Viladomat F. (2006). Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In: Cordell G. A. Ed. *The Alkaloids*. Chicago: Elsevier, Vol 63, 87-179.

- Bate N. J., Orr J., Ni W., Meromi A., Nadler-Hassar T., Doerner P. W., Dixon R. A., Lamb C. J., Elkind Y. (1994). Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **91**: 7608-7612.
- Baumert A., Mock H., Schmidt J., Herbers K., Sonnewald U., Strack D. (2001). Patterns of phenylpropanoids in non-inoculated and potato virus Y-inoculated leaves of transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase. *Phytochemistry* **56**: 535-541.
- Baxter C. J., Redestig H., Schauer N., Repsilber D., Patil K. R., Nielsen J., Selbig J., Liu J., Fernie A. R., Sweetlove L. J. (2007). The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress. *Plant Physiology* **143**: 312-325.
- Berkov S., Evsatieva L., Popov S. (2004). Alkaloids in bulgarian *Pancreatum maritimum* L. *Zeitschrift für Naturforschung C* **59**: 65-69.
- Berova N., Nakanishi K., Woody R. W. (2000). *Circular Dichroism, Principles and Applications*. New York: Wiley-VCH.
- Bertrand C., Noirot M., Doubeau S., de Kochko A., Hamon S., Campa C. (2003). Chlorogenic acid content swap during fruit maturation in *Coffea pseudozanguebariae*. Qualitative comparison with leaves. *Plant Science* **165**: 1355-1361.
- Besford R. T., Richardson C. M., Campos J. L., Tiburcio A. F. (1993). Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta* **189**: 201-206.
- Bhatnagar P., Glasheen B. M., Bains S. K., Long S. L., Minocha R., Walter C., Minocha S. C. (2001). Transgenic manipulation of the metabolism of polyamines in poplar cells. *Plant Physiology* **125**: 2139-2153.
- Bi J. L., Felton G. W. (1995). Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology* **21**: 1511-1530.
- Biasi F., Tessitore L., Zanetti D., Cutrin J. C., Zingaro B., Chiarpotto E., Zarkovic N., Serviddio G., Poli G. (2007). Associated changes of lipid peroxidation and transforming growth factor β 1 levels in human colon cancer during tumour progression. *Gut* **50**: 361-367.

- Bigler L., Hesse M. (1995). Neighboring group participation in the electrospray ionization tandem mass spectra of polyamine toxins of spiders. Part 1: α,ω -diaminoalkane compounds. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **6**: 634-637.
- Bindler G., van der Hoeven R., Gunduz I., Plieske J., Ganal M., Rossi L., Gadani F., Donini P. (2007). A microsatellite marker based linkage map of tobacco. *Theoretical and Applied Genetics* **114**: 341-349.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**: 179-194.
- Boit H. G., Ehmke H. (1957). Alkaloids of *Nerine corusca*, *Nerine flexuosa*, *Pancratium illyricum*, *Lycoris aurea*, and *Lycoris incarnata*. *Chemische Berichte* **90**: 369-373.
- Bokern M., Witte L., Wray V., Nimtz M., Meurer-Grimes B. (1995). Trisubstituted hydroxycinnamic acid spermidines from *Quercus dentata* pollen. *Phytochemistry* **39**: 1371-1375.
- Bortolotti C., Cordeiro A., Alcázar R., Borrell A., Culiñez-Macià F. A., Tiburcio A. F., Altabella T. (2004). Localization of arginine decarboxylase in tobacco plants. *Physiologia Plantarum* **120**: 84-92.
- Brash A. R. (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 23679-23682.
- Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**: 317-333.
- Bray E. A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. (2000). Responses to abiotic stress. In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. Ed. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1158-1203.
- Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P. O., Nam H. G., Lin J., Wu S., Swidzinsky J., Ishizaki K., Leaver C. J. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **42**: 567-585.
- Buchner N., Krumbein A., Rohn S., Kroh L. W. (2006). Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **20**: 3229-3235.

- Bulger E. M., Helton W. S. (1998). Nutrient antioxidants in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology Clinics of North America* **27**: 403-419.
- Burbulis I. E., Iacobucci M., Shirley B. W. (1996). A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **8**: 1013-1025.
- Burke J. J. (2007). Evaluation of source leaf responses to water-deficit stresses in cotton using a novel stress bioassay. *Plant Physiology* **143**: 108-121.
- Cadet J., Berger M., Dauky T. (1997). Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **131**: 1-87.
- Camacho-Cristóbal J. J., Lunar L., Lafont F., Baumert A., González-Fontes A. (2004). Boron deficiency causes accumulation of chlorogenic acid and caffeoyl polyamine conjugates in tobacco leaves. *Journal of Plant Physiology* **161**: 879-881.
- Capell T., Bassie L., Christou P. (2004). Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9909-9914.
- Charles D. J., Renaud E., Simon J. E. (2002). Comparative study of essential oil quantity and composition from ten cultivars of organically grown lavender and lavandin. In: Lis-Balchin M. Ed. *Lavender, The genus Lavandula*. London and New York: Taylor & Francis, Vol 29, 232-242.
- Cheeseman K. H., Slater T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* **49**: 481-493.
- Chen C. T., Kao C. H. (1991). Senescence of rice leaves XXIX. Ethylene production, polyamine level and polyamine biosynthetic enzyme activity during senescence. *Plant Science* **78**: 193-198.
- Chen H., Jones A. D., Howe G. A. (2006). Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS Letters* **580**: 2540-2546.
- Chong J., Pierrel M., Atanassova R., Werck-Riechhart D., Fritig B., Saindrenan P. (2001). Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. Induced accumulation upon elicitation of defence responses and role as salicylic acid precursors. *Plant Physiology* **125**: 318-328.

- Clifford M. N., Johnston K. L., Knight S., Kuhnert N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 2900-2911.
- Clifford M. N., Knight S., Kuhnert N. (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 3821-3832.
- Clifford M. N., Wu W., Kirkpatrick J., Kuhnert N. (2007). Profiling the chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal chrysanthemum by LC-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 929-936.
- Cohen S. S. (1998). *A Guide to the Polyamines*. New York: Oxford University Press.
- Cook N. C., Samman S. (1996). Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry* **7**: 66-76.
- Cos P., Calomme M., Hu J. P., Cimanga K., van Poel B., Pieters L., Vlietinck A. J., Berghe D. V. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products* **61**: 71-76.
- Cos P., Rajan P., Vedernikova I., Calomme M., Pieters L., Vlietinck A. J., Augustyns K., Haemers A., Berghe D. V. (2002). *In vitro* antioxidant profile of phenolic acid derivatives. *Free Radical Biology and Medicine* **36**: 711-716.
- Cowley T., Walters D. R. (2002). Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Plant, Cell and Environment* **25**: 461-468.
- Crawford N. M., Kahn M. L., Leustek T., Long S. R. (2000). Nitrogen and sulfur. *In*: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. Ed. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 786-849.
- Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G. (2000). Natural products (Secondary metabolites). *In*: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. Ed. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1250-1318.
- Cuevas J. C., Sánchez D. H., Marina M., Ruiz O. A. (2004). Do polyamines modulate the *Lotus glaber* NADPH oxidation activity induced by the herbicide methyl viologen? *Functional Plant Biology* **31**: 921-928.

- Cuyckens F., Rozenberg R., de Hoffmann E., Claeys M. (2001). Structure characterization of flavonoid *O*-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **36**: 1203-1210.
- Cuyckens F., Claeys M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* **39**: 1-15.
- Dabire F. M., Muravjova D. A. (1983). Alkaloids of *Pancratium trianthum* Herb. *Farmatsiya* **32**: 22-24.
- Dangl J L., Dietrich R. A., Thomas H. (2000). Senescence and programmed cell death. *In*: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. Ed. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1044-1100.
- Dewick P. (2002). *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. West Sussex: John Willey & Sons, LTD.
- Di Mascio P., Briviba K., Bechara E. J. H., Medeiros M. H. G., Sies H. (1996). Reaction of peroxyxynitrite and hydrogen peroxide to produce singlet molecular oxygen. *Methods in Enzymology* **269**: 395-400.
- Dixon R. A., Xie D., Sharma S. B. (2005). Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* **165**: 9-28.
- Dronne S., Moja S., Jullien F., Berger F., Caissard J. (1999). Agrobacterium-mediated transformation of lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur). *Transgenic Research* **8**: 335-347.
- Echevarría-Machado I., Ku-González A., Loyola-Vargas V. M., Hernández-Sotomayor S. M. T. (2004). Interaction of spermine with a signal transduction pathway involving phospholipase C, during the growth of *Catharanthus roseus* transformed roots. *Physiologia Plantarum* **120**: 140-151.
- El-Hafiz M. A. A., Ramadan M. A. (1990). Minor phenolic constituents of *Crinum augustum*. *Journal of Natural Products* **53**: 1349-1352.
- El Hafiz M. A. A., Ramadan M. A., Jung M. L., Beck J. P., Anton R. (1991). Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum augustum* and *Crinum bulbispermum*. *Planta Medica* **57**: 437-439.

- Erdman J. W., Balentine D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly J., Hollman P., Keen C. L., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G., Burrowes J. (2007). Flavonoids and heart health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31 – June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of Nutrition* **137**: 718S-737S.
- Escarpa A., González M. C. (2001). An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31**: 57-139.
- European Pharmacopoeia Commission (2004). *European Pharmacopoeia (5th edition)*. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Council of Europe, Strasbourg.
- Facchini P. J., Hagel J., Zulak K. G. (2002). Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. *Canadian Journal of Botany* **80**: 577-589.
- Fang N., Yu S., Prior R. L. (2002). LC/MS/MS Characterization of phenolic constituents in dried plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 3579-3585.
- Fernie A. R., Trethewey R. N., Krotzky A. J., Willmitzer L. (2004). Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**: 1-7.
- Ferreres F., Llorach R., Gil-Izquierdo A. (2004). Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **39**: 312-321.
- Fiehn O. (2002). Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* **48**: 155-171.
- Finkel T., Holbrook N. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**: 239-246.
- Fiuza S. M., Van Besien E., Milhazes N., Borges F., Marques M. P. M. (2004). Conformational analysis of a trihydroxylated derivative of cinnamic acid - A combined Raman spectroscopy and Ab initio study. *Journal of Molecular Structure* **693**: 103-118.
- Foyer C. H., Lopez-Delgado H., Dat J. F., Scott I. M. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione- associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* **100**: 241-254.
- Fridovich I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* **64**: 97-112.

- Fridovich I. (1998). An overview of oxyradicals in medical biology. *Advances in Molecular and Cell Biology* **25**: 1-14.
- Gális I., Kakiuchi Y., Šimek P., Wabiko H. (2004). *Agrobacterium tumefaciens* AK-6*b* gene modulates phenolic compound metabolism in tobacco. *Phytochemistry* **65**: 169-179.
- Galston A. W., Sawhney R. K. (1990). Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology* **94**: 406-410.
- Galston A. W., Kaur-Sawhney R., Altabella T., Tiburcio A. F. (1997). Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Botanica Acta* **110**: 197-207.
- Ghosal S., Kumar Y., Singh S. (1984). Glucosyloxy alkaloids from *Pancreatium biflorum*. *Phytochemistry* **23**: 1167-1171.
- Ghosal S., Saini K. S., Razdan S. (1985a). *Crinum* alkaloids: Their chemistry and biology. *Phytochemistry* **24**: 635-637.
- Ghosal S., Singh S. K., Srivastava R. S. (1985b). Flavans from *Zephyranthes flava*. *Phytochemistry* **24**: 151-153.
- Gomes C., Girao da Cruz T., Andrade J. L., Milhazes N., Borges F., Marques M. P. M. (2003). Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: A structure-activity study. *Journal of Medicinal Chemistry* **46**: 5395-5401.
- Gonzalez M. J. T. G., De Oliveira C. J. C., Fernandes J. O., Kijjoa A., Herz W. (1996). Further alkyl and alkenylphenols of *Knema laurina* and *Knema autrosiamensis*: location of the double bond in the alkenyl side chains. *Phytochemistry* **43**: 1333-1337.
- Grace S. C., Logan B. A. (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society B – Biological Sciences* **355**: 1499-1510.
- Ha H. C., Sirisoma N. S., Kuppusamy P., Zweier J. L., Woster P. M., Casero Jr. R. A. (1998). The natural polyamine spermine functions directly as free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **95**: 11140-11145.
- Hagemeier J., Schneider B., Oldham N. J., Hahlbrock K. (2001). Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 753-758.
- Halliwell B. (1995) Human health and disease: a radical look. *Biological Sciences Review* **7**: 21-24.

- Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* **141**: 312-322.
- Halliwell B. (2007). Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research* **73**: 341-347.
- Hammond-Kosack K., Jones J. D. G. (2000). Responses to plant pathogens. In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. Ed. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1102-1156.
- Hancock J. T., Henson D., Nyirenda M., Desikan R., Harrison J., Lewis M., Hughes J., Neill S. J. (2005). Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 828-835.
- Harborne J. B., Dey P., M. (1989). *Methods in Plant Biochemistry*. London: Academic Press.
- Harborne J. B., Williams C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**: 481-504.
- Harborne J. B., Williams C. A. (2002). Phytochemistry of the genus *Lavandula*. In: Lis-Balchin M. Ed. *Lavender, The genus Lavandula*. London and New York: Taylor & Francis, Vol 29, 86-99.
- He X. (2000). On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. *Journal of Chromatography A* **880**: 203-232.
- Hedberg C., Hesse M., Werner C. (1996). Spermine and spermidine hydroxycinnamoyl transferases in *Aphelandra tetragona*. *Plant Science* **113**: 149-156.
- Hegde R. S., Fletcher J. S. (1996). Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology. *Chemosphere* **32**: 2471-2479.
- Hermans N., Cos P., Maes L., De Bruyne T., Berghe D. V., Vlietinck A. J., Pieters L. (2007). Challenges and pitfalls in antioxidant research. *Current Medicinal Chemistry* **14**: 417-430.
- Herrera Velázquez M. (2001). *Aislamiento y elucidación estructural de alcaloides de la familia Amaryllidaceae*. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.

- Hirt H. (2000). Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 2405–2407.
- Hoffmann L., Maury S., Martz F., Geoffroy P., Legrand M. (2003). Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 95-103.
- Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B., Legrand M. (2004). Silencing of hydroxycinnamoyl-Coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell* **16**: 1446-1465.
- Hoshino O. (1998). The Amaryllidaceae alkaloids. In: Cordell G. A. Ed. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. New York: Academic Press, Vol 51, 323-424.
- Hostettmann K., Marston A., Hostettmann M. (2001). *Técnicas de cromatografía preparativa*. Barcelona: Springer.
- Howles P. A., Sewalt V. J. H., Paiva N. L., Elkind Y., Bate N. J., Lamb C., Dixon R. A. (1996). Overexpression of L-phenylalanine ammonia-lyase in transgenic tobacco plants reveals control points for flux into phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiology* **112**: 1617-1624.
- Hu W., Reder E., Hesse M. (1996). Neighboring-group participation in the mass-spectral decomposition of 4-hydroxycinnamoyl-spermidines. *Helvetica Chimica Acta* **79**: 2137-2151.
- Huang D., Ou B., Prior R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 1841-1856.
- Hummel I., Bourdais G., Gouesbet G., Couée I., Malmberg R. L., El Amrani A. (2004). Differential gene expression of *ARGININE DECARBOXYLASE ADC1* and *ADC2* in *Arabidopsis thaliana*: characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development. *New Phytologist* **163**: 519-531.
- Humphreys J. M., Chapple C. (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 224-229.
- Hung W. P., Kao C. H. (1993). Endogenous polyamine levels and flooding-enhanced leaf senescence of tobacco. *Plant Science* **91**: 121-125.

- Hutzler P., Fischbach R., Heller W., Jungblut T. P., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenböck G., Schnitzler J. (1998). Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany* **49**: 953-965.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. (2007). *Fourth Assessment Report: Climate Change 2007*.
- Ithal N., Reddy A. R. (2004). Rice flavonoid pathway genes, *OsDfr* and *OsAns*, are induced by dehydration, high salt and ABA, and contain stress responsible promoter elements that interact with the transcription activator, *OsC1-MYB*. *Plant Science* **166**: 1505-1513.
- Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing K. V., Thomas C. F., Beecher C. W. W., Fong H. H. S., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Mehta R. G., Moon R. C., Pezzuto J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**: 218-220.
- Jin S., Yoshida M., Nakajima T., Murai A. (2003). Accumulation of hydroxycinnamic acid amides in winter wheat under snow. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **67**: 1245-1249.
- Justesen U., Knuthsen P., Leth T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **799**: 101-110.
- Kamel M. S. (1996). Non-alkaloidal compounds from bulbs of *Crinum moorei*. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences Assiut University* **19**: 63-65.
- Kandil F. E., Grace M. H., Seigler D. S., Cheeseman J. M. (2004). Polyphenolics in *Rhizophora mangle* L. leaves and their changes during leaf development and senescence. *Trees* **18**: 518-528.
- Katsube T., Tabata H., Ohta Y., Yamasaki Y., Anuurad E., Shiwaku K., Yamane Y. (2004). Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 2391-2396.
- Keinänen M., Oldham N. J., Baldwin I. T. (2001). Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 3553-3558.

- Khlebnikov A. I., Schepetkin I. A., Domina N. G., Kirpotina L. N., Quinn M. T. (2007). Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15**: 1479-1770.
- Khokhar S., Magnusdottir S. M. (2002). Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 565-570.
- Kimura M., Watson W. H., Pacheco P., Silva M. (1979). *rel*-(2S,3S)-3-Hydroxy-7-methoxy-3',4'-methylenedioxyflavan. *Acta Crystallographica Section B* **35**: 3124-3126.
- Kliebenstein D. J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant, Cell and Environment* **27**: 675-684.
- Koleva I., Van Beek T. A., Linssen J. P. H., De Groot A., Evstatieva L. N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis* **13**: 8-17.
- Kong J., Chia L., Goh N., Chia T., Brouillard R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**: 923-933.
- Krinsky N. I. (1993). Actions of carotenoids in biological systems. *Annual Review of Nutrition* **13**: 561-587.
- Krinsky N. I. (1998). The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences* **854**: 443-447.
- Kumar A., Altabella T., Taylor M. A., Tiburcio A. F. (1997). Recent advances in polyamine research. *Trends in Plant Science* **2**: 124-130.
- Kusano T., Yamaguchi K., Berberich T., Takahashi Y. (2007). Advances in polyamine research in 2007. *Journal of Plant Research* **120**: 345-350.
- Kuznetsov VI. V., Radyukina N. L., Shevyakova N. I. (2006). Polyamines and stress: biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology* **53**: 583-604.
- Labraña J., Machocho A. K., Kricsfalusy V., Brun R., Codina C., Viladomat F., Bastida J. (2002). Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry* **60**: 847-852.

- Lamaison J. L., Petitjean-Freytet C., Carnat A. (1990). Teneurs en acide rosmarinique, en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activité antioxydante chez les Apiacées, les Borraginacées et les Lamiacées médicinales. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **48**: 103-108.
- Legaz M. E., de Armas R., Piñon D., Vicente C. (1998). *Journal of Experimental Botany* **49**: 1723-1728.
- Leubner-Metzger G., Amrhein N. (1993). The distribution of hydroxycinnamoylputrecines in different organs of *Solanum tuberosum* and other solanaceous species. *Phytochemistry* **32**: 551-556.
- Li J., Ou-Lee T., Raba R., Amundson R. G., Last R. L. (1993). *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *The Plant Cell* **5**: 171-179.
- Li Y., Yang J., Li W. Z., Hou L., Xue J., Li Y. (2001). Studies on flavans. 1. Facile synthesis of (\pm)-7-hydroxy-3',4'-methylenedioxyflavan and (\pm)-4'-hydroxy-7-methoxyflavan by $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -mediated pyran cyclization. *Journal of Natural Products* **64**: 214-216.
- Li Z., Wang L., Yang G., Shi G., Jiang C., Liu W. (2003). Study on the determination of polyphenols in tobacco by HPLC coupled with ESI-MS after solid-phase extraction. *Journal of Chromatographic Science* **41**: 36-40.
- Lis-Balchin M., Hart S. (1999). Studies on the mode of action of essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). *Phytotherapy Research* **13**: 540-542.
- Logan B. A., Grace S. C., Adams W. W., Demmig-Adams B. (1998). Seasonal differences in xanthophyll cycle characteristics and antioxidants in *Mahonia repens* growing in different light environments. *Oecologia* **116**: 9-17.
- López-Arnaldos T., Zapata J. M., Calderón A. A., Barceló A. R. (1997). Antioxidant activity of lavandin (*Lavandula x intermedia*) cell cultures in relation to their rosmarinic acid content. *ACS Symposium Series* **660**: 206-218.
- MacDonald-Wicks L., Wood L. G., Garg M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**: 2046-2056.
- Manthey J. A. (2000). Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation* **7**: S29-S34.
- Máñez S., Giner R. M. (2003). Alcaloides. In: Máñez S., Giner R. M. Ed. *Farmacognòsia: de la Natura al Medicament*. València: Universitat de València, 157-164.

- Marcé M., Brown D. S., Capell T., Figueras X., Tiburcio A. F. (1995). Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *Journal of Chromatography B* **666**: 329-335.
- Martens S., Mithöfer A. (2005). Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* **66**: 2399-2407).
- Masaki H., Sakaki S., Atsumi T., Sakurai H. (1995). Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **18**: 162-166.
- Mayer M. J., Narbad A., Parr A. J., Parker M. L., Walton N. J., Mellon F. A., Michael A. J. (2001). Rerouting the plant phenylpropanoid pathway by expression of a novel bacterial enoyl-CoA hydratase/lyase enzyme function. *The Plant Cell* **13**: 1669-1682.
- Meerow A. W., Snijman D. A. (1998). Amaryllidaceae. In: Kubitzki K. Ed. *The Families and Genera of Vascular Plants*. Berlin: Springer, Vol 3, 83-110.
- Meerow A. W., Lehmilller D. J., Clayton J. R. (2003). Phylogeny and biogeography of *Crinum* L. (Amaryllidaceae) inferred from nuclear and limited plastid non-coding DNA sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 349-363.
- Messiaen J., Van Cutsem P. (1999). Polyamines and pectins. II. Modulation of pectic-signal transduction. *Planta* **208**: 247-256.
- Meunier C. (1992). *Lavandes et Lavandins*. Aix-en-Provence: Édisund.
- Meurer B., Wiermann R., Strack D. (1988). Phenylpropanoid patterns in fagales pollen and their phylogenetic relevance. *Phytochemistry* **27**: 823-828.
- Miao Y., Zentgraf U. (2007). The antagonist function of *Arabidopsis* WRKY53 and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicylic acid equilibrium. *The Plant Cell* **19**: 819-830.
- Min B. S., Gao J. J., Nakamura N., Kim Y. H., Hattori M. (2001). Cytotoxic alkaloids and a flavan from the bulbs of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **49**: 1217-1219.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410.
- Moller I. M., Kristensen B. K. (2006). Protein oxidation in plant mitochondria detected as oxidized tryptophan. *Free Radical Biology and Medicine* **40**: 430-435.

- Moreau R. A., Nuñez A., Singh V. (2001). Diferuloylputrescine and *p*-coumaroyl-feruloylputrescine, abundant polyamine conjugates in lipid extracts of maize kernels. *Lipids* **36**: 839-844.
- Morgan T., Morden W., Al-muhareb E., Herod A., Kandiyoti R. (2006). Essential oils investigated by size exclusion chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Energy & Fuels* **20**: 734-737.
- Morris K., Mackerness S., Page T., John C. F., Murphy A. M., Carr J. P., Buchanan-Wollaston V. (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal* **23**: 677-685.
- Mount P. F., Power D. A. (2006). Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiologica* **187**: 433-446.
- Naczki M., Shahidi F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**: 1523-1542.
- Nakatani N., Kayano S., Kikuzaki H., Sumino K., Katagiri K., Mitani T. (2000). Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 5512-5516.
- Negrel J., Javelle F., Paynot M. (1991). Separation of putrescine and spermidine hydroxycinnamoyl transferases extracted from tobacco callus. *Phytochemistry* **30**: 1089-1092.
- Nijveldt R. J., van Nood E., van Horn D. E. C., Boelens P. G., van Norren K., van Leeuwen P. A. M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* **74**: 418-425.
- Nimtz M., Bokern M., Meurer-Grimes B. (1996). Minor hydroxycinnamic acid spermidines from pollen of *Quercus dentata*. *Phytochemistry* **43**: 487-489.
- Noctor G., Foyer C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279.
- Nordal I. (1987). Amaryllidacées. In: Sabatié B., Morat P. Ed. *Flore du Cameroun*. Yaoundé: Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, Vol 30, 3-31.
- Panagabko C., Chenier D., Fixon-Owoo S., Atkinson J. K. (2000). Ion-pair HPLC determination of hydroxycinnamic acid monoconjugates of putrescine, spermidine and spermine. *Phytochemical Analysis* **11**: 11-17.

- Panasenko O. M. (1997). The mechanism of the hypochlorite-induced lipid peroxidation. *Biofactors* **6**: 181-190.
- Parejo I., Kefalas P., Petrakis C., Codina C. (2000). Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH free radical assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **46**: 1-6.
- Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlage N., Burillo J., Codina C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 6882-6890.
- Parejo I., Caprai E., Bastida J., Viladomat F., Jáuregui O., Codina C. (2004a). Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. *Journal of Ethnopharmacology* **94**: 175-184.
- Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Codina C. (2004b). Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C₁₈ column. *Analytica Chimica Acta* **512**: 271-280.
- Parejo I., Jáuregui O., Viladomat F., Bastida J., Codina C. (2004c). Characterization of acyclated flavonoid-*O*-glycosides and methoxylated flavonoids from *Tagetes maxima* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**: 2801-2810.
- Paull R. E., Chen N. J., Deputy J. (1985). Physiological changes associated with senescence of cut *Anthurium* flowers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **110**: 156-162.
- Paya M., Halliwell B., Houlst R. S. (1992). Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochemical Pharmacology* **44**: 205-214.
- Peipp H., Maier W., Schmidt J., Wray V., Strack D. (1997). Arbuscular mycorrhizal fungus-induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots. *Phytochemistry* **44**: 581-587.
- Pérez de Paz P. L., Hernández Padrón C. E. (1999). *Plantas Medicinales o Útiles en la Flora Canaria, Aplicaciones Populares*. La Laguna: Francisco Lemus.

- Pettit G. R., Gaddamidi V., Cragg G. M., Herald D. L., Sagawa Y. (1984). Isolation and structure of pancratistatin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **24**: 1693-1694.
- Pietta P. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **63**: 1035-1042.
- Pourcel L., Routaboul J., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* **12**: 29-36.
- Rajaraman V., Nonnecke B. J., Franklin S. T., Hammell D. C., Horst R. L. (1998). Effect of vitamins A and E on nitric oxide production by blood mononuclear leukocytes from neonatal calves fed milk replacer. *Journal of Dairy Sciences* **81**: 3278-3285.
- Ramadan M. A., Kamel M. S., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K. (2000). Minor phenolics from *Crinum Bulbispermum* bulbs. *Phytochemistry* **54**: 891-896.
- Ramarathnam N., Osawa T., Ochi H., Kawakishi S. (1995). The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science & Technology* **6**: 75-82.
- Rangaswami S., Rao R. V. K. (1966). Isolation and structure of a new alkaloid norneronine from bulbs of *Pancratium longiflorum*. *Tetrahedron Letters* **37**: 4481-4484.
- Rao R. V., Devi V. (1965). Chemical components of *Pancratium triflorum*. *Indian Journal of Pharmacy* **27**: 82.
- Revilla E., García-Beneytez E., Cabello F., Martín-Ortega G., Ryan J. M. (2001). Value of high-performance liquid chromatography analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A* **915**: 53-60.
- Reyes L. F., Cisneros-Zevallos L. (2003). Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 5296-5300.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **20**: 933-956.
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **66**: 401-436.
- Robards K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* **1000**: 657-691.

- Rosenberg E. (2003). The potential of organic (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionization) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis. *Journal of Chromatography A* **1000**: 841-889.
- Ryan D., Robards K., Prenzler P., Antolovich M. (1999). Applications of mass spectrometry to plant phenols. *Trends in Analytical Chemistry* **18**: 362-372.
- Saghatelian A., Cravatt B. F. (2005). Global strategies to integrate the proteome and metabolome. *Current Opinion in Chemical Biology* **9**: 62-68.
- Sánchez-Moreno C., Larrauri J. A., Saura-Calixto F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **76**: 270-276.
- Sánchez-Moreno C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* **8**: 121-137.
- Sánchez-Rabaneda F., Jáuregui O., Casals I., Andrés-Lacueva C., Izquierdo-Pulido M., Lamuela-Raventós R. M. (2003a). Liquid chromatographic/electrospray ionisation tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry* **38**: 35-42.
- Sánchez-Rabaneda F., Jáuregui O., Lamuela-Raventós R. M., Bastida J., Viladomat F., Codina C. (2003b). Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1008**: 57-72.
- Sánchez-Rabaneda F., Jáuregui O., Lamuela-Raventós R. M., Viladomat F., Bastida J., Codina C. (2004). Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**: 553-563.
- Sandberg F., Michel K. H. (1968). Alkaloids of *Pancratium maritimum* (Amaryllidaceae). *Acta Pharmaceutica Suecica* **5**: 61-66.
- Schafer F. Q., Wang H. P., Kelley E. E., Cueno K. L., Martin S. M., Buettner G. R. (2002). Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. *Biological Chemistry* **383**: 671-681.
- Schenk P. M., Kazan K., Rusu A. G., Manners J. M., Maclean D. J. (2005). The *SEN1* gene of *Arabidopsis* is regulated by signals that link plant defence responses and senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 997-1005.

- Schütz K., Kammerer D., Carle R., Schieber A. (2004). Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) Heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 4090-4096.
- Sener B., Konukol S., Cornellis K., Pandit U. K. (1994). Alkaloids of crinine class from *Pancreatum maritimum*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* **16**: 275-279.
- Shahrzad S., Bitsch I. (1996). Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **741**: 223-231.
- Shan B., Cai Y. Z., Sun M., Corke H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 7749-7759.
- Sharaf A., Fahmy I. R., Ahmed Z. F., Rizk A. M. (1960). A pharmacological study of *Pancreatum sickenbergeri*. *Planta Medica* **8**: 322-327.
- Sharma V., Vaid N. (1997). Age-related changes in indolic and phenolic compounds in leaves from enforced salix shoot bud. *Indian Journal of Plant Physiology* **2**: 207-210.
- Shellie R., Mondello L., Marriott P., Dugo G. (2002). Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **970**: 225-234.
- Shen B. (2000). Biosynthesis of aromatic poliketides. In: Leeper F. J., Vederas J. C. Ed. *Biosynthesis Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids*. Berlin: Springer.
- Shenan J. J. (1996). Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **83**: 679-686.
- Siquet C., Paiva-Martins F., Lima J. L. F. C., Reis S., Borges F. (2006). Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids. A structure-activity relationship study. *Free Radical Research* **40**: 433-442.
- Simmonds M. S. J. (2003). Flavonoids-insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry* **64**: 21-30.
- Slade D., Ferreira D., Marais J. P. J. (2005). Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry* **66**: 2177-2215.

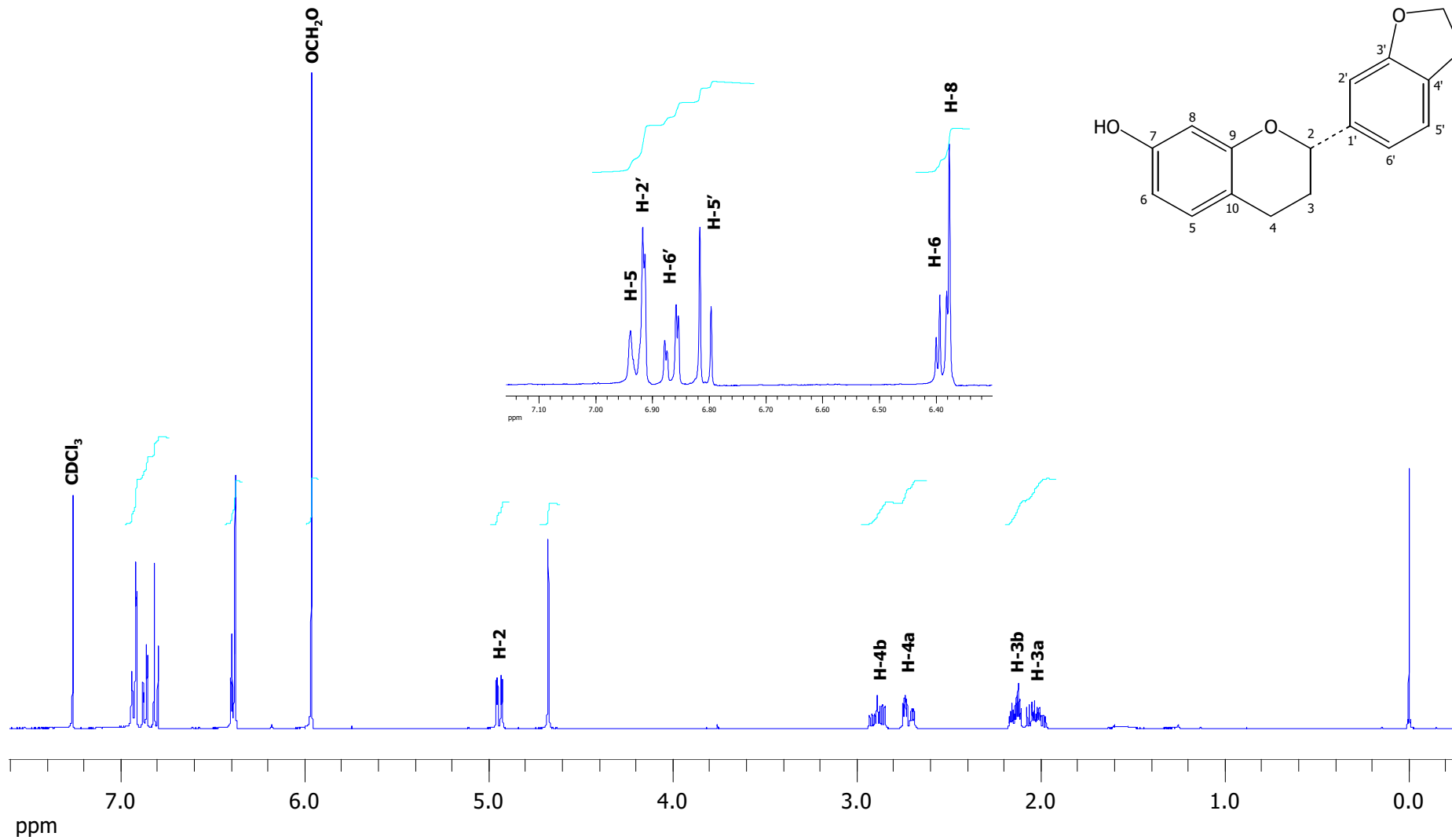
- Smirnoff N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 229-235.
- Smith R. D., Loo J. A., Edmonds C. G., Barinaga C. J., Udseth H. R. (1990). New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Analytical Chemistry* **62**: 882-899.
- Smith R. M. (2004). *Understanding Mass Spectra: a Basic Approach*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Snijman D. A., Linder H. P. (1996). Phylogenetic relationships, seed characters, and dispersal system evolution in Amaryllideae (Amaryllidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **83**: 362-386.
- Soobrattee M. A., Neergheen V. S., Luximon-Ramma A., Aruoma O. I., Bahorun T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* **579**: 200-213.
- Sood S., Nagar P. K. (2003). The effect of polyamines on leaf senescence in two diverse rose species. *Plant Growth Regulation* **39**: 155-160.
- Soyka S., Heyer A. G. (1999). *Arabidopsis* knockout mutation of *ADC2* gene reveals inducibility by osmotic stress. *FEBS Letters* **458**: 219-223.
- Sreenivasulu N., Sopory S. K., Kavi Kishor P. B. (2007). Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene* **388**: 1-13.
- Steinbeck M. J., Khan A. U., Karnovsky M. J. (1992). Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 13425-13433.
- Stobiecki M. (2000). Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* **54**: 237-256.
- Stobiecki M., Skiryicz A., Kerhoas L., Kachlicki P., Muth D., Einhorn J., Mueller-Roeber B. (2006). Profiling of phenolic glycosidic conjugates in leaves of *Arabidopsis thaliana* using LC/MS. *Metabolomics* **2**: 197-219.
- Strandhagen E., Hansson P-O., Bosaeus I., Isaksson B., Eriksson H. (2000). High fruit intake may reduce mortality among middle-aged and elderly men. The study of men born in 1913. *European Journal of Clinical Nutrition* **54**: 337-341.

- Sweetlove L. J., Heazlewood J. L., Herald V., Holtzapffel R., Day D. A., Leaver C. J., Millar A. H. (2002). The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *The Plant Journal* **32**: 891-904.
- Takahama U., Oniki T. (1997). A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum* **101**: 845-852.
- Takahashi H., Chen Z., Du H., Liu Y., Klessig D. F. (1997). Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels. *The Plant Journal* **11**: 993-1005.
- Tanner G. J., Francki K. T., Abrahams S., Watson J. M., Larkin P. J., Ashton A. R. (2003). Proanthocyanidin biosynthesis in plants. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 31647-31656.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.
- Tiburcio A. F., Kaur-Sawhney R., Galston A. W. (1990). Polyamine metabolism. In: Mifflin B. J., Lea P. J. Ed. *The Biochemistry of Plants, Intermediary Nitrogen Metabolism*. New York: Academic Press, Vol 16, 283-325.
- Tiburcio A. F., Altabella T., Borrell A., Masgrau C. (1997). Polyamine metabolism and its regulation. *Physiologia Plantarum* **100**: 664-674.
- Tomás-Barberán F. A., Espín J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**: 853-876.
- Tram N. T. N., Titorenkova T. V., Bankova V. St., Handjieva N. V., Popov S. S. (2002). *Crinum* L. (Amaryllidaceae). *Fitoterapia* **73**: 183-208.
- Treutter D., Feucht W., Schmid P. P. S. (1987). Ageing-dependent responses of phloem flavonoids of *Prunus avium* graftings: flavanone-, flavone- and isoflavone-glucosides. *Scientia Horticulturae* **32**: 183-193.
- Troncoso N., Sierra H., Carvajal L., Delpiniano P., Günther G. (2005). Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet-visible quantification of principal phenolic antioxidants in fresh rosemary. *Journal of Chromatography A* **1100**: 20-25.
- Tura D., Robards K. (2002). Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of Chromatography A* **975**: 71-93.

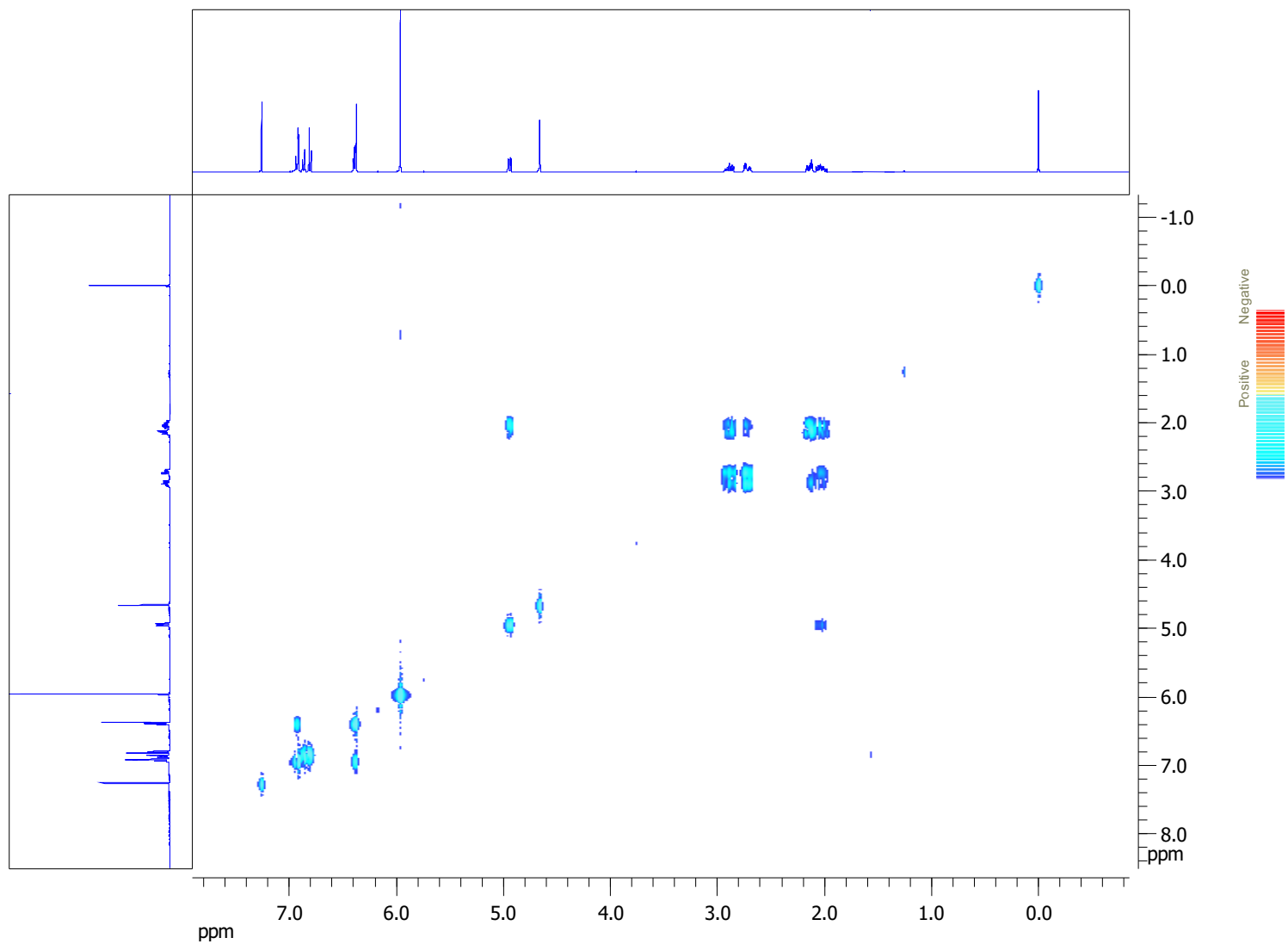
- Upson T. M., Grayer R. J., Greenham J. R., Williams C. A., Al-Ghamdi F., Chen F. (2000). Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical Systematics and Ecology* **28**: 991-1007.
- Upston J. M., Terentis A. C., Stocker R. (1999). Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *The FASEB Journal* **13**: 977-994.
- Valls O. (1998). Espectroscopía infraroja. In: Valls O., del Castillo B. Ed. *Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud*. Barcelona: Ediciones Piro, 138-153.
- Vázquez Tato M. P., Castedo L., Riguera R. (1988). New alkaloids from *Pancratium maritimum* L. *Heterocycles* **27**: 2833-2838.
- Verberne M. C., Brouwer N., Delbianco F., Linthorst H. J. M., Bol J. F., Verpoorte R. (2002). Method for the extraction of the volatile compound salicylic acid from tobacco leaf material. *Phytochemical Analysis* **13**: 45-50.
- Vial J., Jardy A., Menet J. (2001). Validation of internal normalization for impurity assays. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **24**: 2067-2085.
- Vincent D., Lapierre C., Pollet B., Cornic G., Negroni L., Zivy M. (2005). Water deficits affect caffeate *O*-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiology* **137**: 949-960.
- Vinson J. A., Dabbagh Y. A., Serry M. M., Jang J. (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**: 2800-2802.
- Von Roepenack-Lahaye E., Degenkolb T., Zerjeski M., Franz M., Roth U., Wessjohann L., Schmidt J., Scheel D., Clemens S. (2004). Profiling of *Arabidopsis* secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole Time-of-Flight mass spectrometry. *Plant Physiology* **134**: 548-559.
- Waksmundzka-Hajnos M. (1998). Chromatographic separations of aromatic carboxylic acids. *Journal of Chromatography B* **717**: 93-118.
- Walters D., Meurer-Grimes B., Rovira I. (2001). Antifungal activity of three spermidine conjugates. *FEMS Microbiology Letters* **201**: 255-258.
- Walters D. R. (2003). Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* **64**: 97-107.
- Waris G., Ashan H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis* **5**: 14.

- Waterman P. G., Mole S. (1994). *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Weiss G., Gordeuk V. R. (2005). Benefits and risks of iron therapy for chronic anaemias. *European Journal of Clinical Investigation* **35**: 36-45.
- Weissman K. J. (2004). Polyketide biosynthesis: understanding and exploiting modularity. *Philosophical Transactions of The Royal Society A – Mathematical Physical and Engineering Sciences* **362**: 2671-2690.
- Werner C., Hu W., Lorenzi-Riatsch A., Hesse M. (1995). Di-coumaroylspermidines and tri-coumaroylspermidines in anthers of different species of the genus *Aphelandra*. *Phytochemistry* **40**: 461-465.
- Werner I., Bacher A., Eisenreich W. (1997). Retrobiosynthetic NMR studies with ¹³C-labeled glucose. Formation of gallic acid in plants and fungi. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 25474-25482.
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langerbartels C., Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *The EMBO Journal* **16**: 4806-4816.
- Wink D. A., Mitchell J. B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* **25**: 434-456.
- Wink M. (1998a). A short history of alkaloids. In: Roberts M. F., Wink M. Ed. *Alkaloids. Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. New York and London: Plenum Press.
- Wink M. (1998b). Chemical ecology of alkaloids. In: Roberts M. F., Wink M. Ed. *Alkaloids. Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. New York and London: Plenum Press.
- Wink M., Roberts M. F. (1998). Compartmentation of alkaloid synthesis, transport, and storage. In: Roberts M. F., Wink M. Ed. *Alkaloids. Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. New York and London: Plenum Press.
- Winkel B. S. J. (2004). Metabolic channeling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 85-107.
- Winkel-Shirley B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* **126**: 485-493.
- Wiseman H., Halliwell B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal* **313**: 17-29.

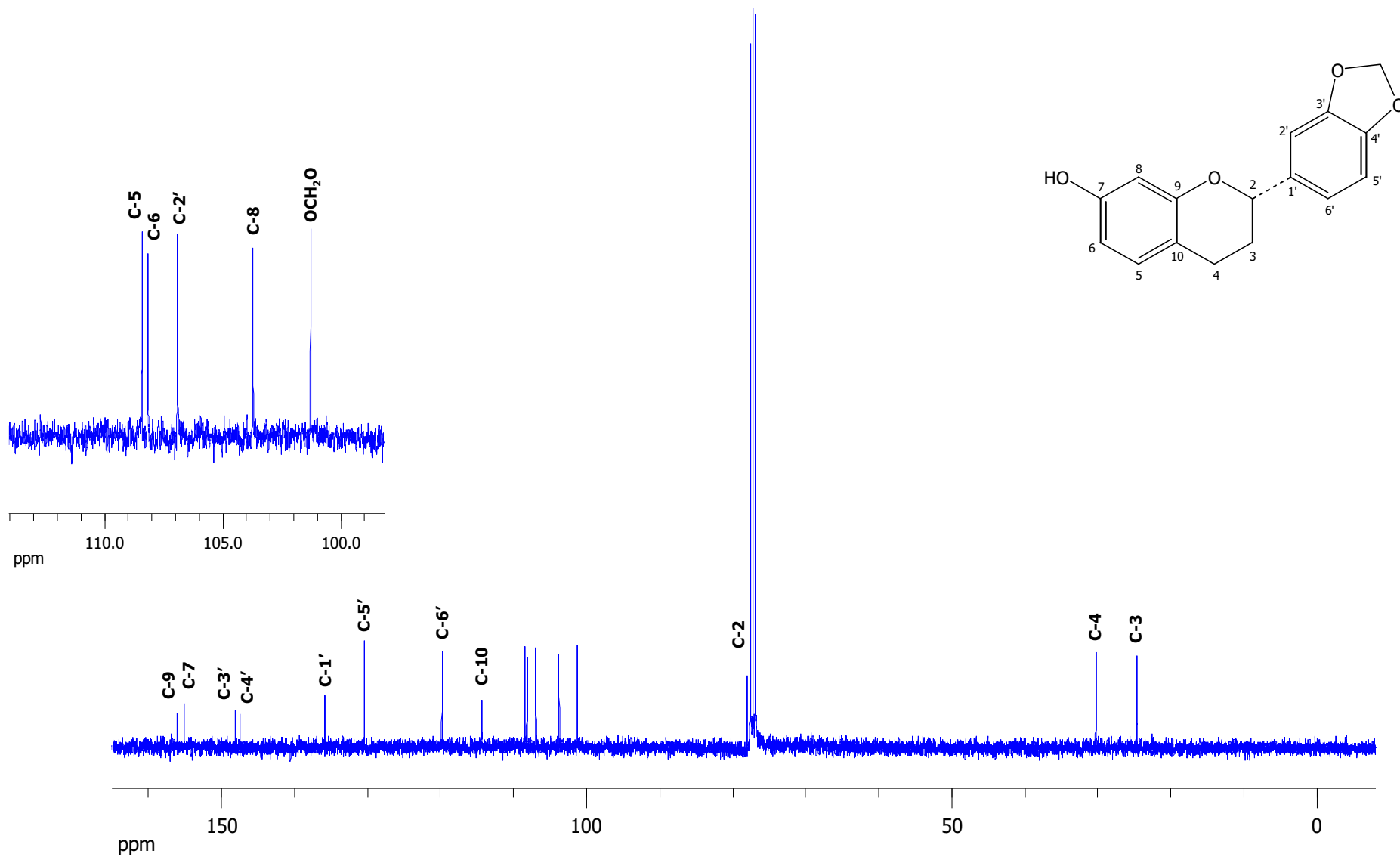
- Wojtaszek P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* **322**: 681-692.
- Xie D. Y., Sharma S. B., Paiva N. L., Ferreira D., Dixon R. A. (2003). Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. *Science* **299**: 396-399.
- Xie D. Y., Dixon R. A. (2005). Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? *Phytochemistry* **66**: 2127-2144.
- Yalpani N., Enyedi A. J., León J., Raskin I. (1994). Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* **193**: 372-376.
- Yamaguchi K., Takahashi Y., Berberich T., Imai A., Miyazaki A., Takahashi T., Michael A., Kusano T. (2006). The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **580**: 6783-6788.
- Yamasaki H., Sakihama Y., Ikehara N. (1997). Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiology* **115**: 1405-1412.
- Yildirim A., Mavi A., Oktay M., Kara A., Algur Ö., Bilaloğlu V. (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC), Sage (*Salvia triloba* L.) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 5030-5034.
- Yoda H., Hiroi Y., Sano H. (2006). Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiology* **142**: 193-206.
- Youssef, D. T. A., Frahm A. W. (1998). Alkaloids of the flowers of *Pancratium maritimum*. *Planta Medica* **64**: 669-670.
- Youssef, D. T. A. (1999). Further alkaloids from the flowers of *Pancratium maritimum*. *Pharmazie* **54**: 535-537.
- Youssef, D. T. A. (2003). Bioactive principles of the flowers of *Pancratium maritimum*. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences Assiut University* **26**: 171-177.
- Zana M., Janka Z., Kálmán J. (2007). Oxidative stress: a bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **28**: 648-676.
- Zeier J. (2005). Age-dependent variations of local and systemic defence responses in *Arabidopsis* leaves towards an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. *Plant Pathology* **66**: 30-39.



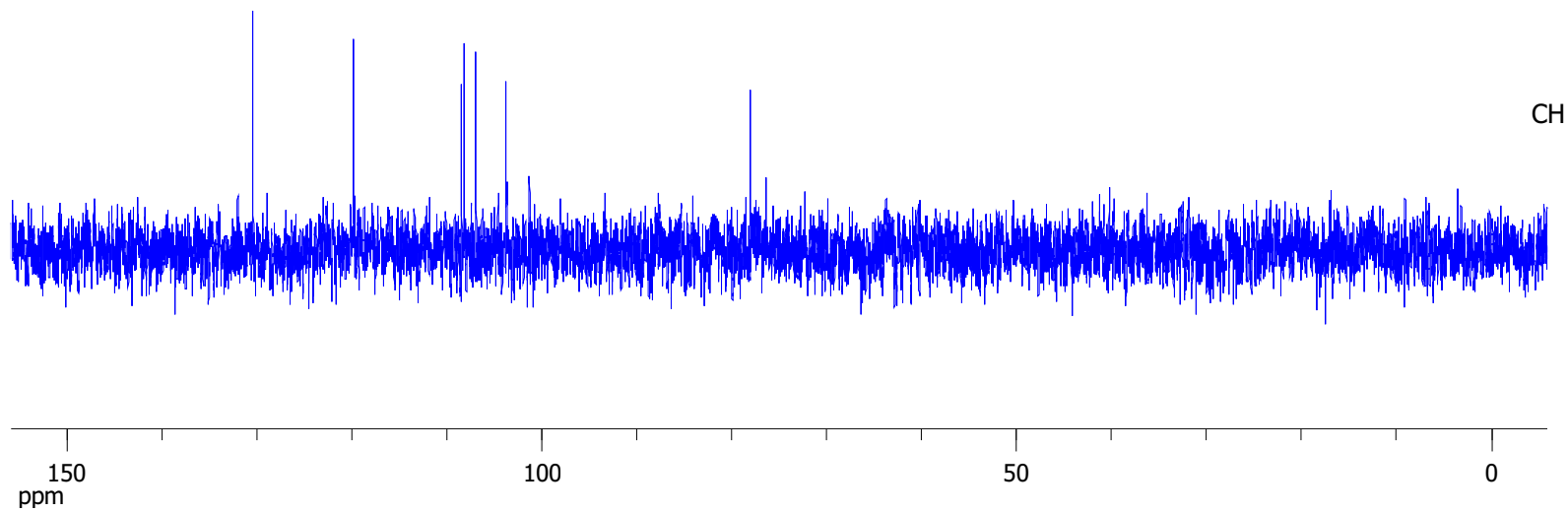
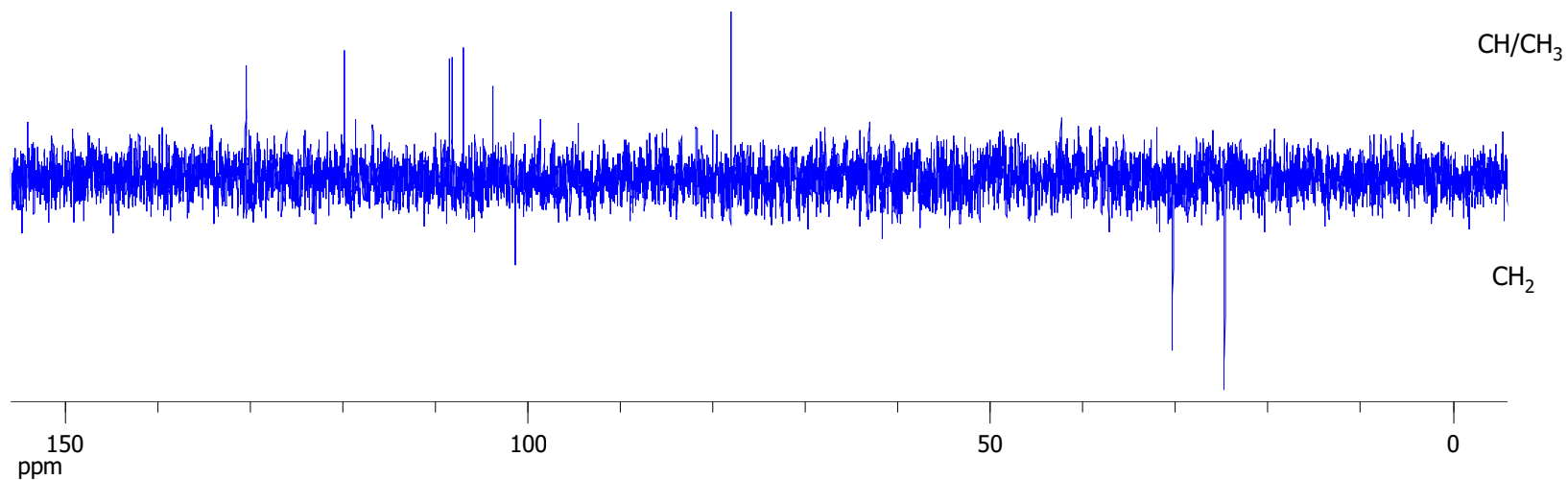
A1.- Espectre de NMR de ¹H de 7-hidroxi-3',4'-metilendioxi flavà (CHU1)



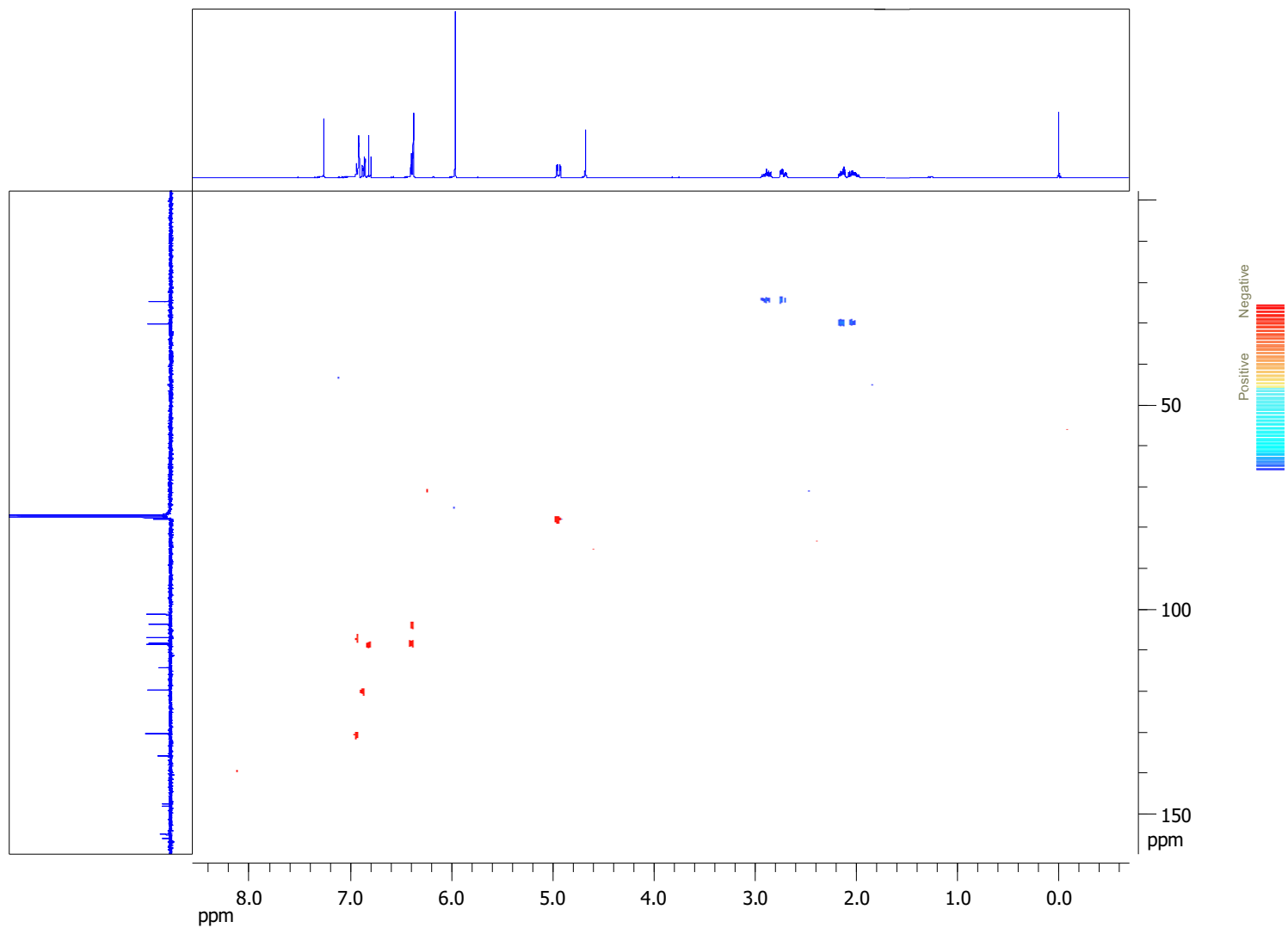
A2.- Espectre de NMR de COSY de 7-hidroxi-3',4'-metilendioxi-flavà (CHU1)



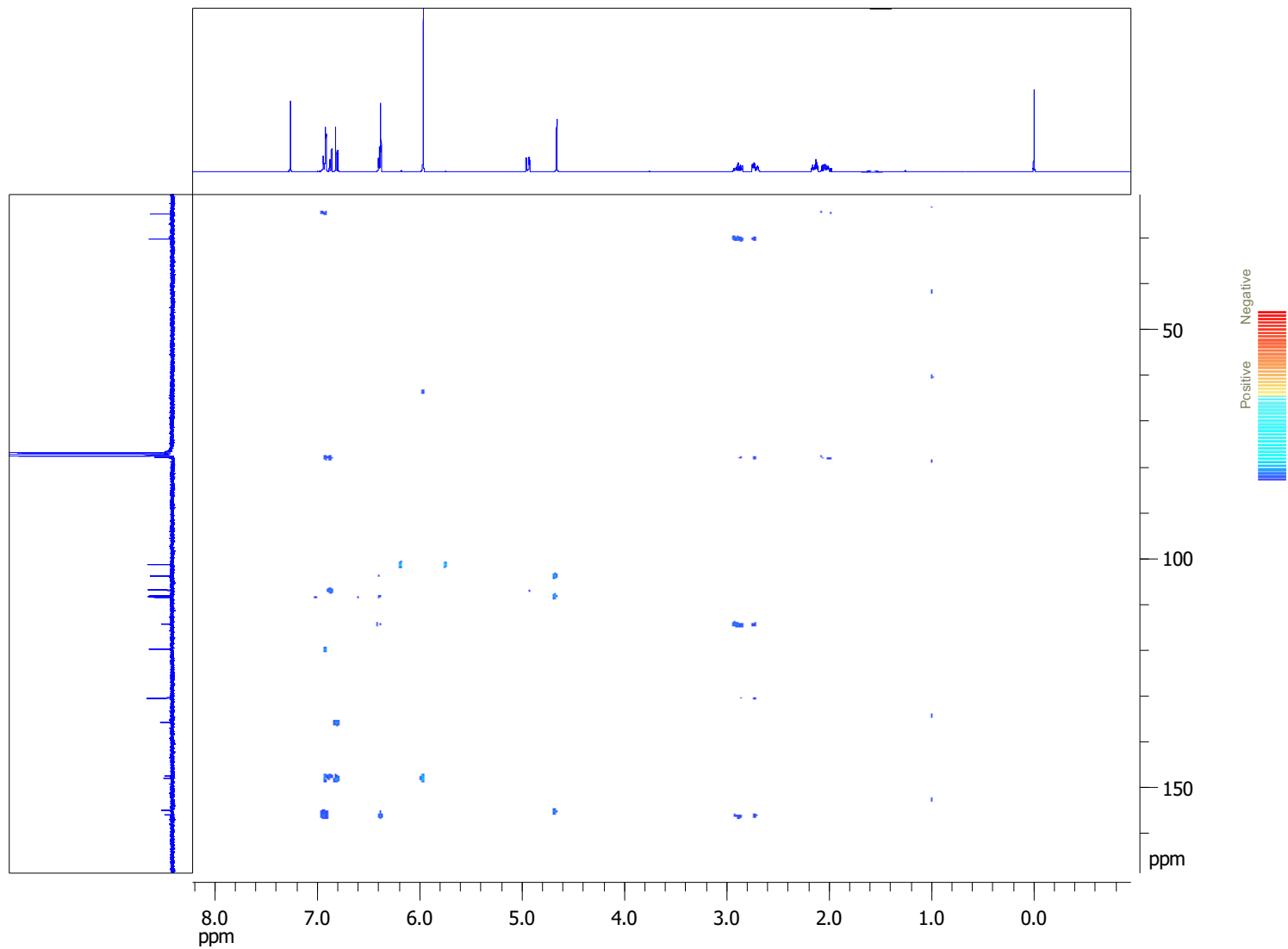
A3.- Espectre de NMR de ^{13}C de 7-hidroxi-3',4'-metilendioxi flavà (CHU1)



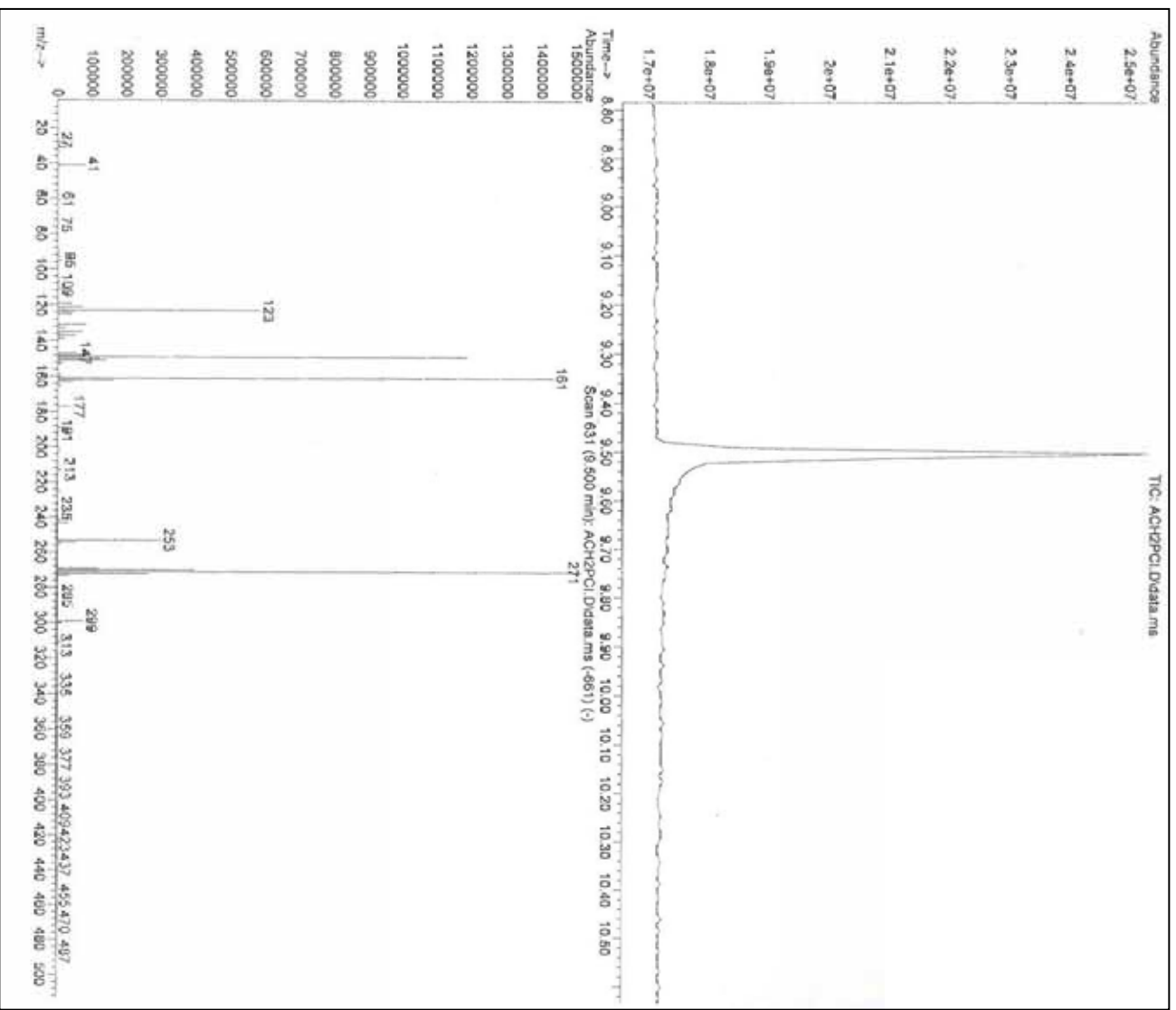
A4.- Espectre de NMR de DEPT de 7-hidroxi-3',4'-metilendioxyflavà (**CHU1**)



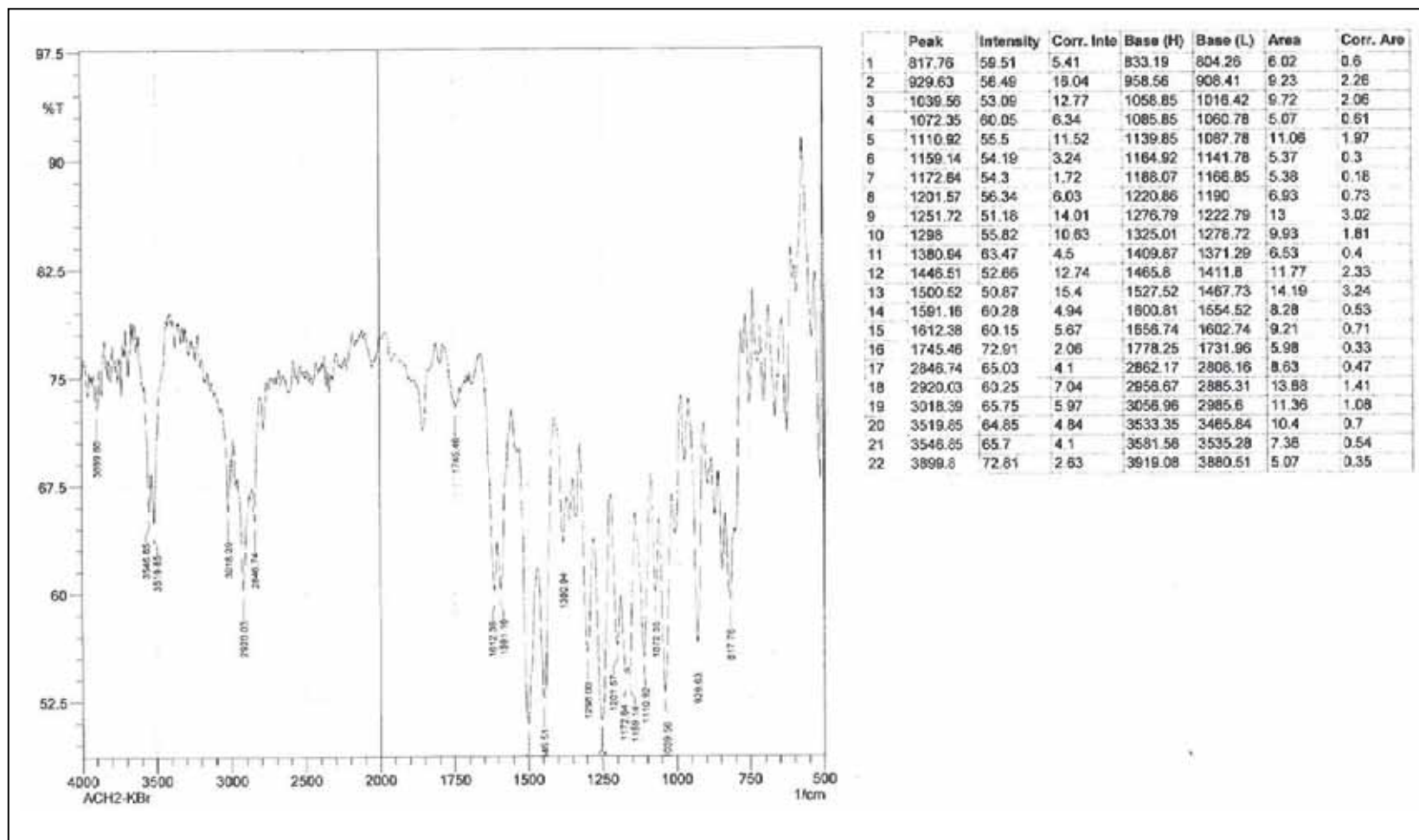
A5.- Espectre de NMR de HSQC de 7-hidroxi-3',4'-metilendioxyflavà (CHU1)



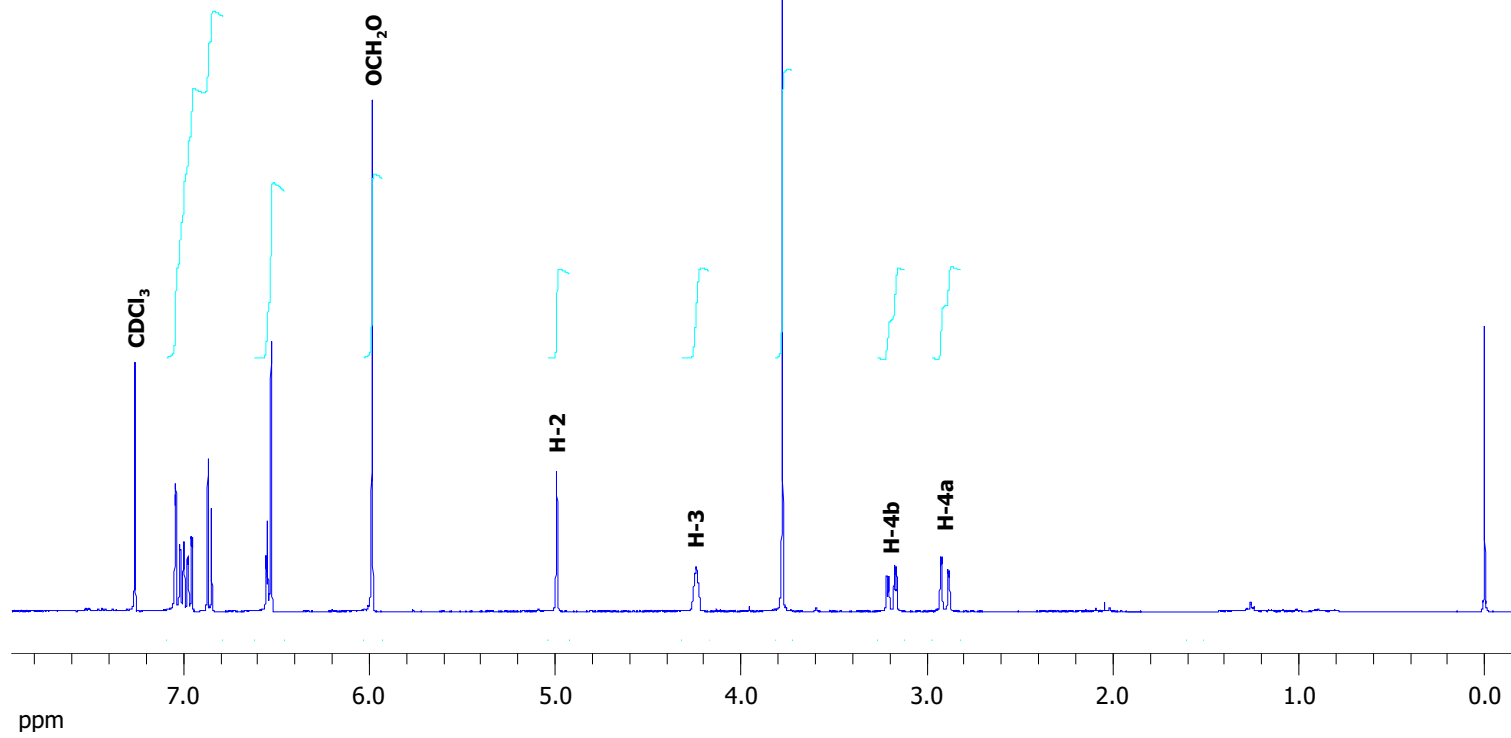
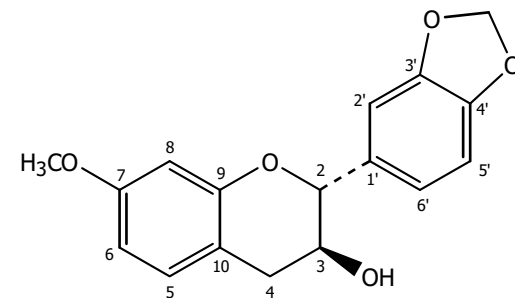
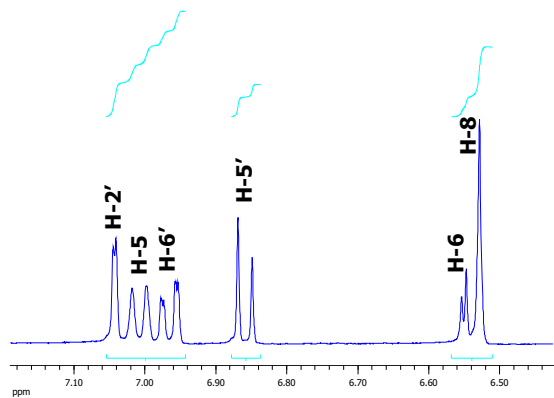
A6.- Espectre de NMR de HMBC de 7-hidroxi-3',4'-metilendioxi flavà (CHU1)



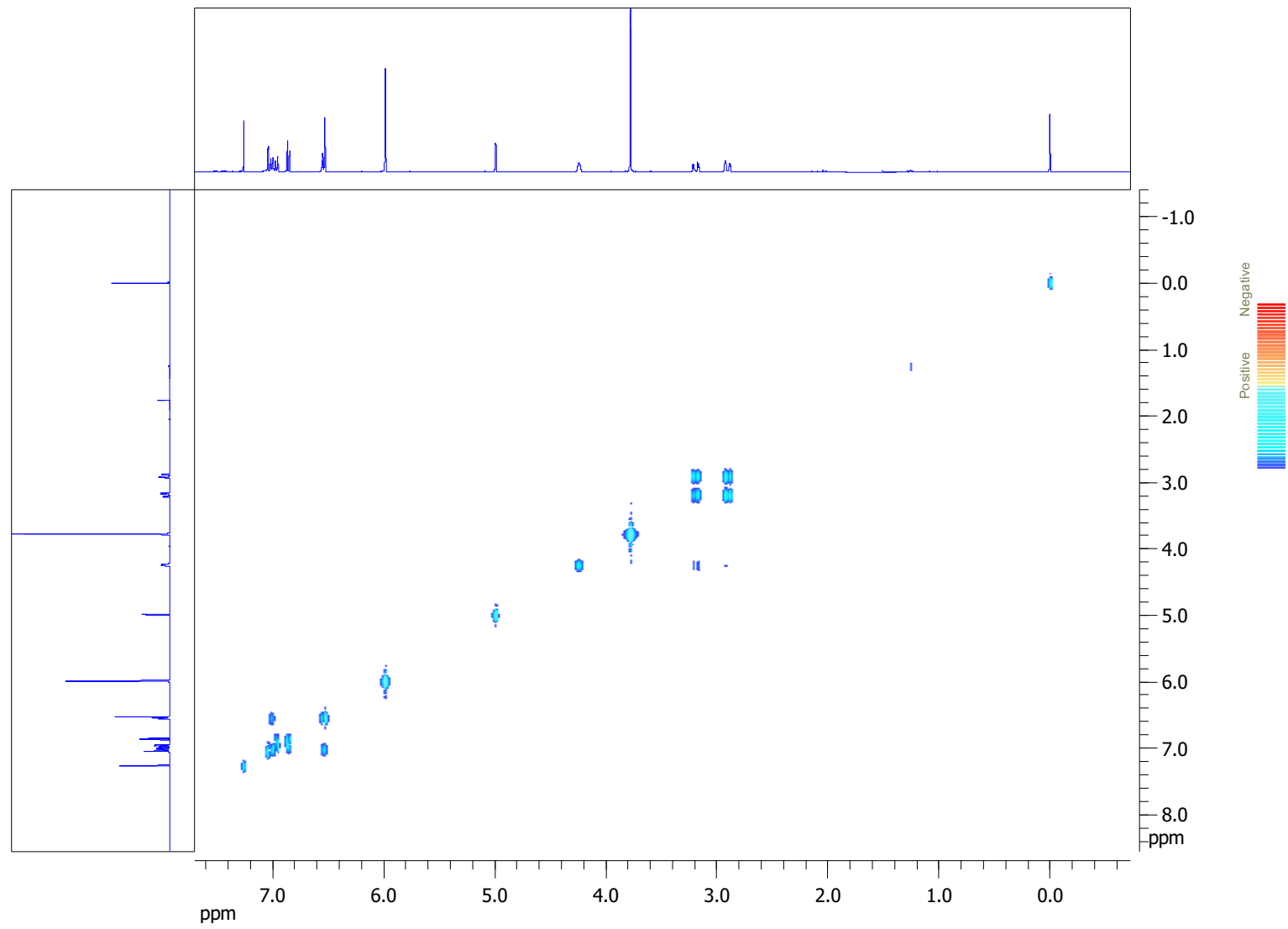
A7- Espectre de masses de 7-hidroxi-3',4'-metilendioxiFlavà (**CHU1**) obtingut per GC-MS per Cl. Apareix l'ió $[M + H]^+$ de m/z 271, que correspon a una Mw de 270.



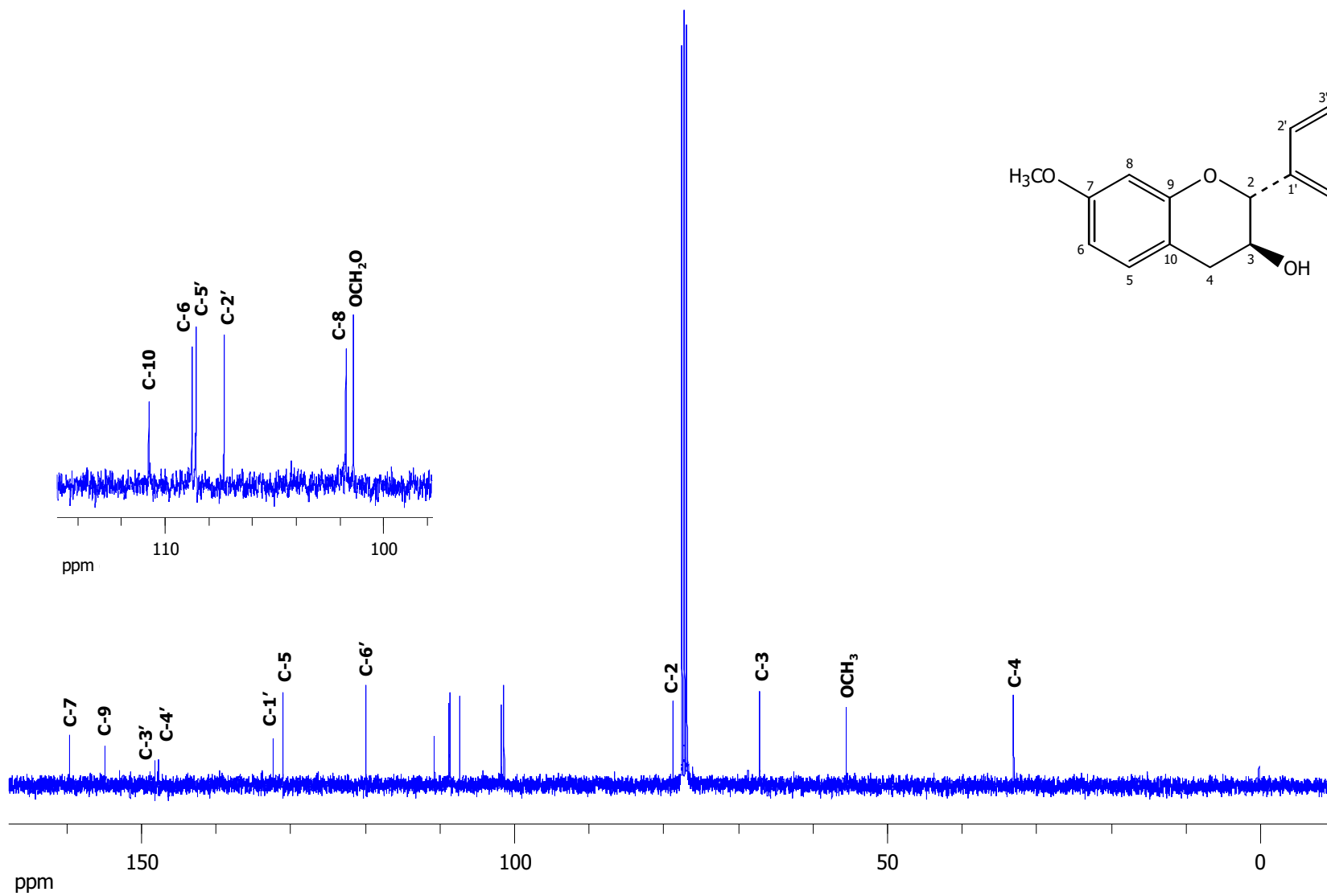
A8.- Espectre de IR de 7-hidroxi-3',4'-metilendioxyflavà (CHU1)



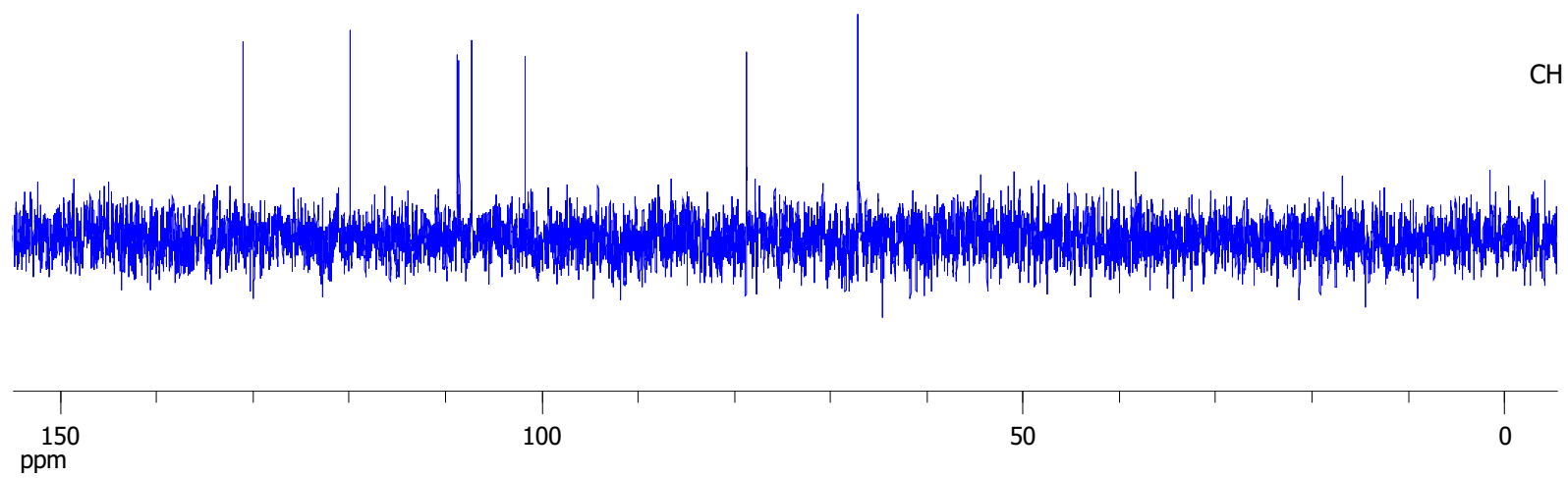
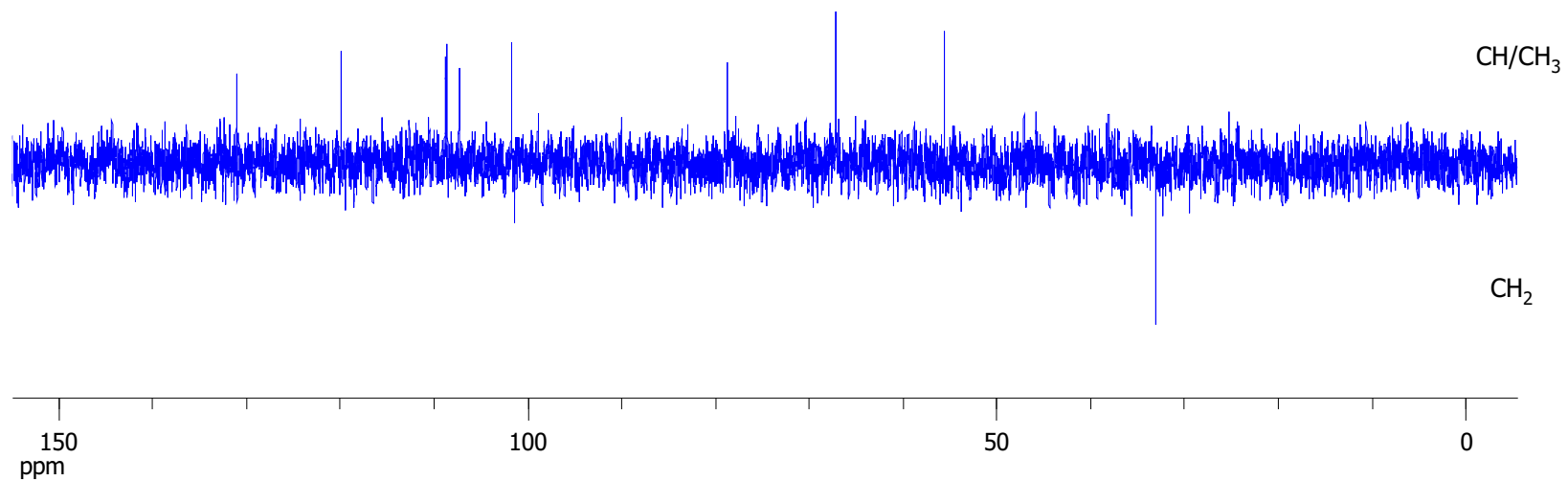
A9.- Espèctre de NMR de ^1H de 3-hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxiflavà (CHU2)



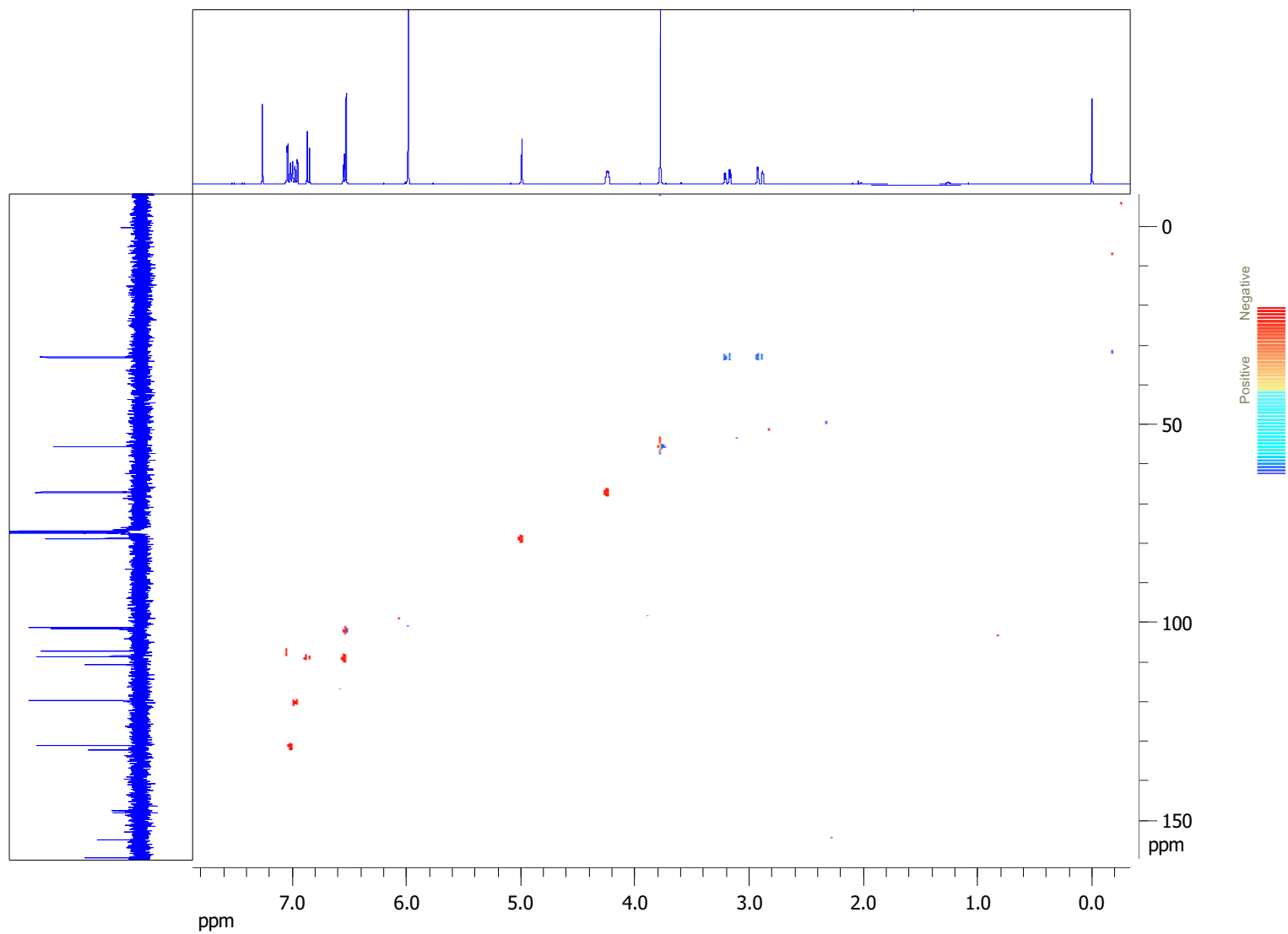
A10.- Espectre de NMR de COSY de 3-hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxi-flavà (CHU2)



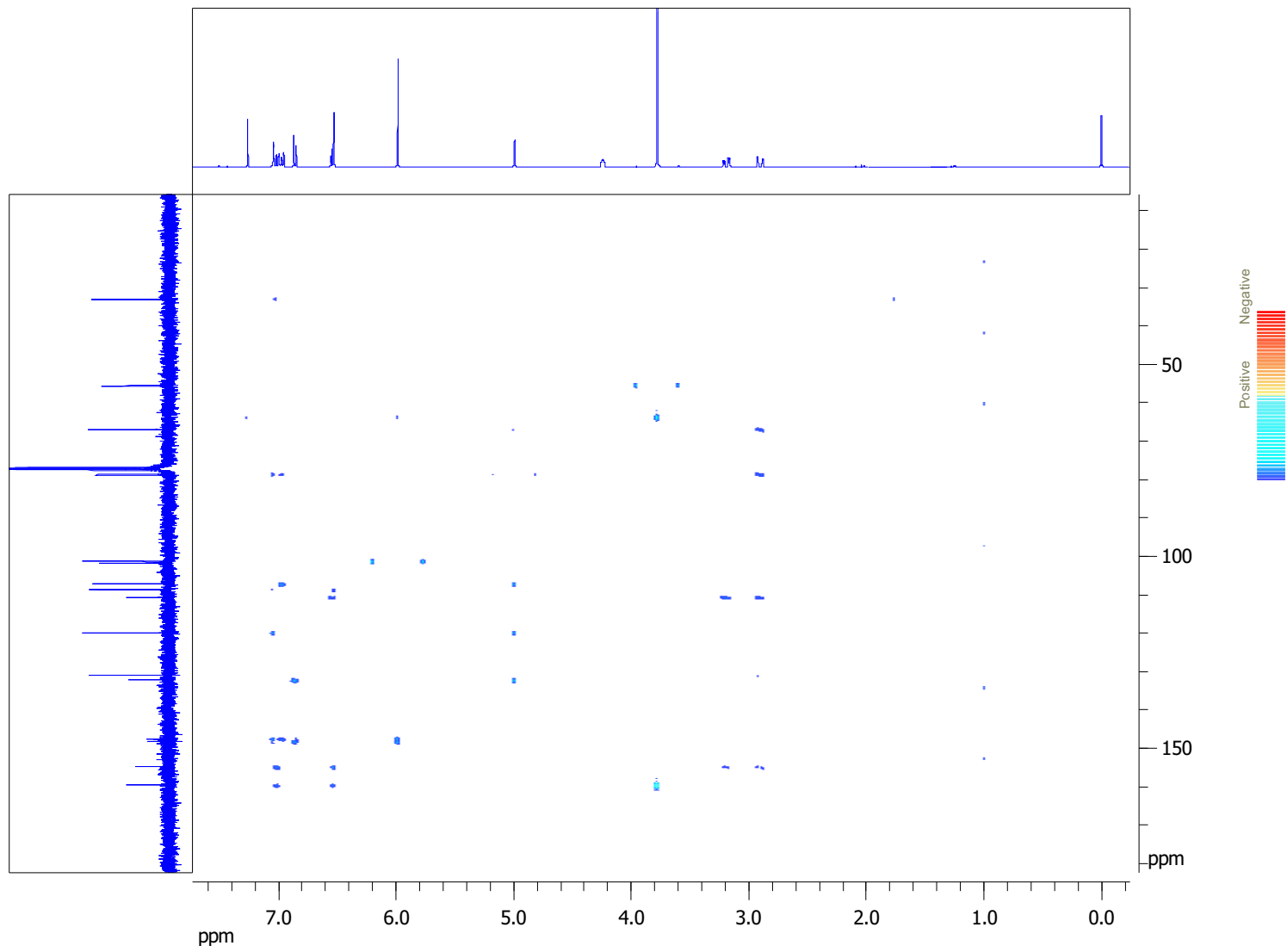
A11.- Espectre de NMR de ^{13}C de 3-hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxi-flavà (CHU2)



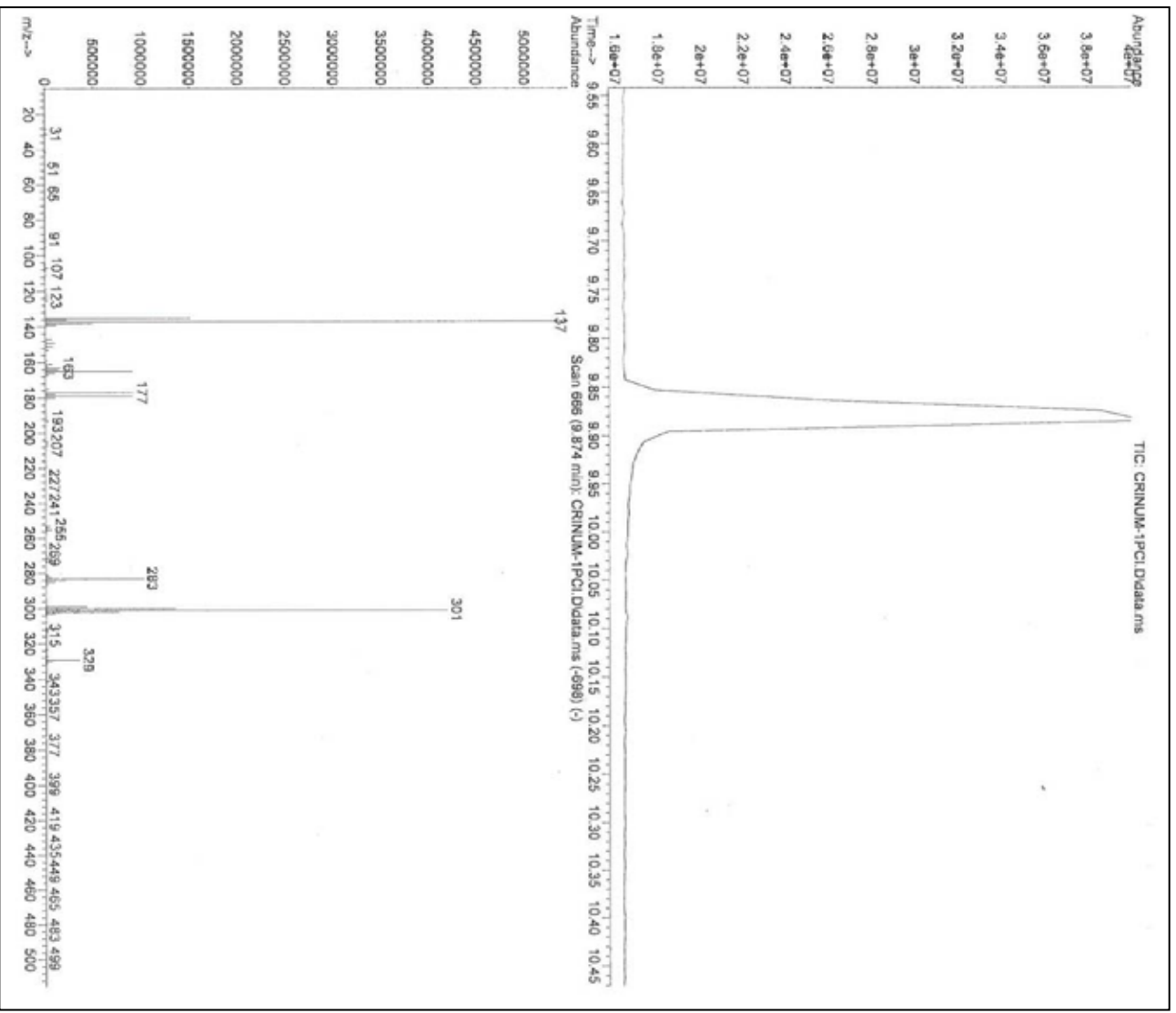
A12.- Espectre de NMR de DEPT de 3-hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxi-flavà (CHU2)



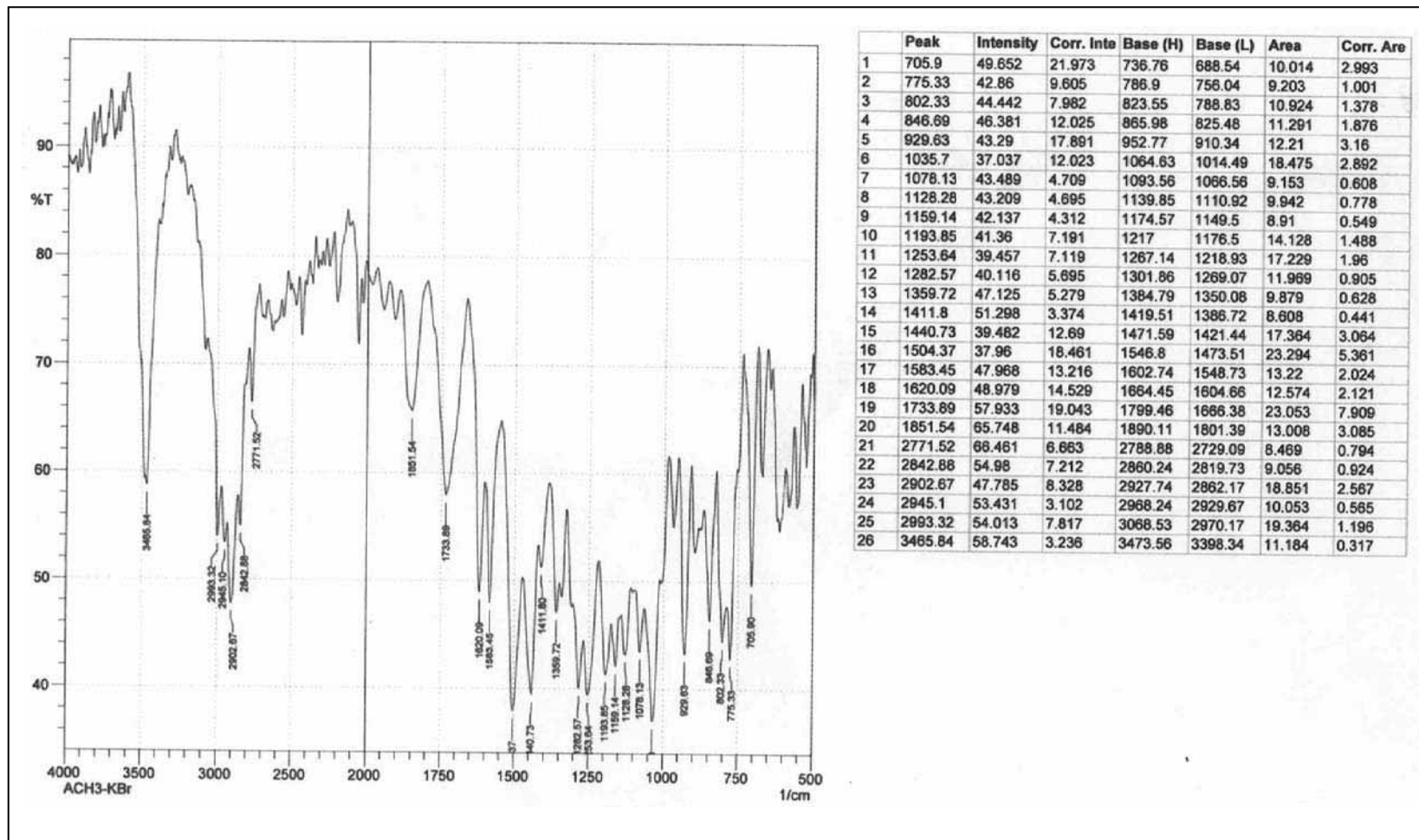
A13.- Espectre de NMR de HSQC de 3-hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxi-flavà (CHU2)



A14.- Espectre de NMR de HMBC de 3-hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxi-flavà (CHU2)



A15.- Espectre de masses de 3-hidroxí-7-metoxi-3',4'-metilendioxi flavà (**CHU2**) obtingut per GC-MS per CI. Apareix l'ió $[M + H]^+$ de m/z 301, que correspon a una M_w de 300.



A16.- Espectre de IR de 3-hidroxi-7-metoxi-3',4'-metilendioxyflavà (CHU2)