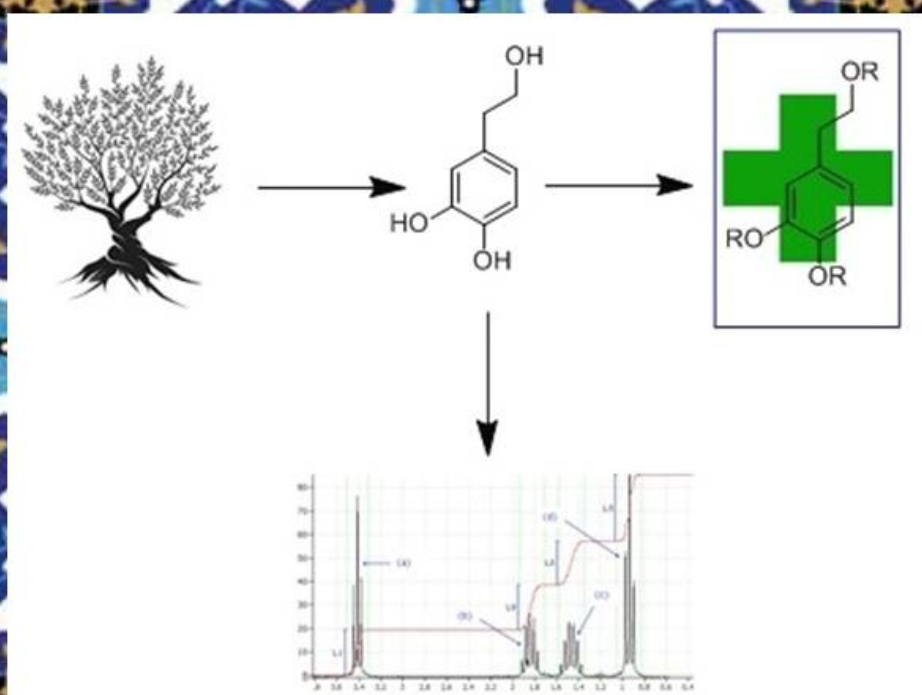


**AISLAMIENTO Y SEMISÍNTESIS DE COMPUESTOS
FENÓLICOS POR VÍA QUÍMICA Y BIOCATALÍTICA.
ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES BIOLÓGICAS.**



Ignacio Francisco Fernández Pastor

Tesis Doctoral

Octubre 2018

UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Orgánica



TESIS DOCTORAL

**AISLAMIENTO Y SEMISÍNTESIS DE
COMPUESTOS FENÓLICOS POR VÍA QUÍMICA Y
BIOCATALÍTICA. ESTUDIO DE SUS
PROPIEDADES BIOLÓGICAS.**

Ignacio Francisco Fernández Pastor

Granada, Octubre 2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ignacio Francisco Fernández Pastor
ISBN: 978-84-1306-014-9
URI: <http://hdl.handle.net/10481/53863>

Agradecimientos

... Sentado en la sala de estudios de la Universidad de Glasgow, se me hace complicado recordar el momento exacto en que todo esto empezó, pero creo que la idea de hacer una Tesis en química orgánica me vino en una sala de estudio de la Universidad de Rennes, vaya cosas... Estando allí, recuerdo escribir un correo a quien ha sido mi Director, el Catedrático **D. Andrés Parra Sánchez**, a quien ya conocía por su excelente labor como profesor en varias asignaturas de la carrera. Su calidad docente, su pasión por la química, el buen carácter y la paciencia, siempre han estado presentes, en todos estos años. Gracias por todo lo aprendido.

Quisiera expresar, igualmente, mi agradecimiento a mi codirector el profesor **D. Francisco Rivas Sánchez**, por su inestimable ayuda con los artículos, también por sus consejos tanto químicos con enológicos. Sin olvidarme por supuesto de dar las gracias al Catedrático **D. Andrés García-Granados López del Hierro** y al Profesor **D. Antonio Martínez Rodríguez**, grandes maestros, excelentes químicos y mejores personas. Cualquiera que haya pasado una mañana a las 9:00 por la cafetería de la Facultad de Ciencias les habrá visto discutir sobre el último partido del Madrid.

Me gustaría agradecer especialmente al **Dr. D. Ali Haïdour** quien ha tenido más paciencia que un santo conmigo y a la **Dra. D^a Laura Méndez Liñán**, por la realización de tantísimos espectros de Resonancia Magnética Nuclear para la elucidación estructural de los compuestos que se relacionan en la presente Memoria. También a **D. Juan Moliz Medina** y **D^a Yolanda Madrid Fernández**, por la realización de los espectros de masas. Y al resto de profesionales de que han contribuido a la realización de estos artículos, en especial: a **Dr. Antonio Luque Muñoz**, **Dra. Antonia Hernández Hernández** y **D. Sergio Pérez Criado**.

A todos mis compañer@s de laboratorio de estos años, y en especial a Alberto, Samuel y Marta, quienes estuvieron justo al principio y dedicaron mucho de su tiempo a enseñarme los entresijos del lab, además de aguantarme con Radio3, sesiones de música electrónica de Siglo21 incluidas, “Nacho nos vas a volver majaras a tod@s”.

A mis compañer@s de carrera, por todas las horas de clase, de biblioteca y de cafetería que nos hemos pegado. No sería justo en este apartado no comentar a Jesús y sus apuntes que daba gloria verlos, a Fran que además de ser un gran científico es tan friki como yo, y por supuesto a Adrian una de las personas más geniales que he conocido.

A mis amig@s de Granada, Víctor, Alba, Manolillo, Pili... A Diego, nada de estos últimos quince años en Granada hubieran sido lo mismo sin ti, y a Huayqui, por todas las horas de guitarra, viajes a festivales, noches de fiesta, horas hablando de ciencia y mil cosas más. A mis amig@s de Cuenca, Cristian, Ángel, Víctor, Héctor, Edu, Marina, Nacho... Porque “genio y figura hasta la sepultura” encontrarnos todos en vacaciones es como sentir que el tiempo no pasa.

A toda mi familia, los que están y los que se fueron. En especial a mis padres Paco y Marian, desde pequeño me habéis enseñado a ser valiente, que las cosas no se dejan a medias, y que esta vida esta para aprender y disfrutar; sin vuestro apoyo y amor no lo hubiera conseguido. A mi hermanita Ana, con la que he jugado y peleado desde que cumplí un año y es la mejor hermana del mundo. Os quiero muchísimo y las cervezas saben mejor con vosotros.

Por último, y dejando lo mejor para el final, quisiera agradecer de todo corazón el cariño recibido por mi familia de Granada: Antonio, Carmina, Anton, María José, Alberto, Carmina, Rocío, Fran, María Ángeles y l@s pequeñ@s. Muchísimas gracias por todo.

Y acabando como no podría ser de otro modo GRACIAS a Cris, con mayúsculas bien merecidas: por toda la paciencia, por cuidar de mí, por los ánimos, por enseñarme a madrugar para ir a correr y un trillón de cosas más... Eres la persona más buena, trabajadora y con mayor fuerza de voluntad que he conocido... después de 8 años me sigues sorprendiendo colega! Te amo Crispy.

"Todo en la vida es momentáneo"

Philip K. Dick

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

ABTS	Acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico)
AO	Ácido oleanólico (ácido 3 β – hidroxiolean-12-en-28-oico)
AM	Ácido maslínico
Ac ₂ O	Anhídrido acético
[α] _D	Poder rotatorio
Boc	Grupo protector terc-butiloxicarbonilo
Boc ₂ O	Dicarbonato de di-terc-butilo
¹³ C RMN	Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono
CHCl ₃	Cloroformo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble doblete
DMC	Diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMA	N,N'-dimetilanilina
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	N,N'-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DIEA	N,N'-diisopropiletilamina
Et ₃ N	Trietilamina
ET ₂ O	Dietil éter
EtOAc	Acetato de etilo
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonil
FRAP	Ferric reducing ability of plasma
g	Gramo
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
¹ H RMN	Espectro de resonancia magnética nuclear de protones
HTy	Hidroxitirosol
IC ₅₀	Concentración que inhibe la proliferación celular al 50%
IPP	Pirofosfato de 3-isopentenilo
IR	Espectro de infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
m	Multiplete
Me	Metilo

MeOH	Metanol
Me ₂ CO	Acetona
Min	Minuto
m/z	Relación carga masa
nm	Nanómetros
p.f.	Punto de fusión
PEG	Polietilenglicol
Ppm	Partes por millón
RT	Room Temperature
S	Singlete
T	Triplete
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía de capa fina
Ty	Tirosol

A Granada

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. GENERALIDADES DE PRODUCTOS NATURALES.....	1
1.2. BIOGÉNESIS.....	4
1.2.1. Biogénesis de los Ácidos Maslínico y Oleanólico.....	4
1.2.2. Biogénesis de Polifenoles	10
1.3. FUENTES DE PRODUCTOS NATURALES.....	15
1.3.1. Fuentes Naturales de los Ácidos Maslínico y Oleanólico	15
1.3.2. Fuentes Naturales de Tirosol e Hidroxitirosol.....	17
1.3.3. Fuentes Naturales de LDopa	19
1.4. UTILIDAD E IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS PRODUCTOS NATURALES... 20	
1.5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN	23
1.5.1. Métodos de Extracción de Productos Naturales	23
1.5.2. Métodos para la Separación y Purificación de Productos Naturales.....	27
1.5.3. Principales Técnicas para la Cuantificación de Productos Naturales.....	28
1.5.4. Aislamiento y Caracterización de los Ácidos Maslínico y Oleanólico	29
1.5.5. Aislamiento y Caracterización de Tirosol e Hidroxitirosol.....	31
1.5.6. Aislamiento y Caracterización de LDopa	33
1.6. EL OLIVO (<i>OLEA EUROPAEA</i>).....	35
1.7. LA MUCUNA (<i>MUCUNA PRURIENS</i>).....	34
1.8. CATECOLES. Reactividad del Anillo Catecólico	42
1.9. DERIVATIZACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES. Derivatización de Polifenoles.....	48
1.10. ANTIOXIDANTES. Ensayos de compuestos como Antioxidantes.....	55
1.11. ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA. Ensayos de citotoxicidad. Ensayo MTT	65
1.12. OBJETO DEL TRABAJO	68

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. AISLAMIENTO DE LOS PRINCIPALES METABOLITOS.....	73
2.1.1. Obtención de los Ácidos Maslínico y Oleanólico.....	73
2.1.2. Obtención de L-Dopa.....	74
2.1.3. Obtención de Tirosol e Hidroxitirosol.....	74
2.2. INSTRUMENTACIÓN GENERAL BÁSICA.....	75
2.3. TÉCNICAS GENERALES CROMATOGRÁFICAS	76
2.3.1. Cromatografía Flash a Media Presión	76
2.3.2. Cromatografía en Capa Fina (CCF)	76
2.3.3. Cromatografía Líquida de Alta Presión Acoplada a Espectrometría de Masas	77
2.4. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL	77
2.4.1. Espectrometría de Masas	77
2.4.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	78
2.4.3. Espectroscopía de IR	78
2.4.4. Rotaciones Específicas ($[\alpha]_D$)	78
2.5. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE SÍNTESIS EN DISOLUCIÓN.....	79
2.5.1. Método General de Acetilación Química.....	79
2.5.2. Método General de Acetilación Enzimática.....	79
2.5.3. Método General de Laurificación Enzimática.....	79
2.5.4. Método General de Saponificación.....	79
2.5.5. Método General de Bencilación	79
2.5.6. Método General de Hidrogenación Catalítica	80
2.5.7. Método General de Metilcarbonatación.....	80
2.5.8. Método General de Carbonatación de Dioles.....	80
2.5.9. Método General de Acetonación de Dioles.....	80
2.5.10. Método General de Esterificación de un Ácido con un Alcohol.....	80
2.5.11. Método General de Protección de una Amina con Boc.....	81
2.5.12. Método General de Formación de Cloroformiato sobre un Alcohol.....	81
2.5.13. Método General de Adición de un Alcohol a Cloroformiato.....	81

CAPÍTULO 3. MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION VS SOXHLET EXTRACTION TO DETERMINE TRITERPENE ACIDS IN OLIVE SKINS

3.1. INTRODUCTION	87
3.2. MATERIALS AND METHODS.....	88
3.3. RESULTS.....	95
3.4. DISCUSSION.....	97
3.5. CONCLUDING REMARKS	100
3.6. REFERENCES	102

CAPÍTULO 4. QUANTITATIVE NMR ANALYSIS OF L-DOPA IN SEEDS FROM TWO VARIETIES OF MUCUNA PRURIENS

4.1. INTRODUCTION	111
4.2. EXPERIMENTAL.....	112
4.3. RESULTS AND DISCUSSION	116
4.4. REFERENCES	121
4.5 SUPPORTING INFORMATION.....	123
4.6 CHEMICAL SEMI-SYNTHESSES OF L-DOPA DERIVATIVES	126

CAPÍTULO 5. SYNTHESIS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HYDROXYTYROSOL ALKYL-CARBONATE DERIVATIVES

5.1. INTRODUCTION	133
5.2. RESULTS AND DISCUSSION	134
5.3. EXPERIMENTAL SECTION	140
5.4. REFERENCES	150
5.5. SUPPORTING INFORMATION.....	153

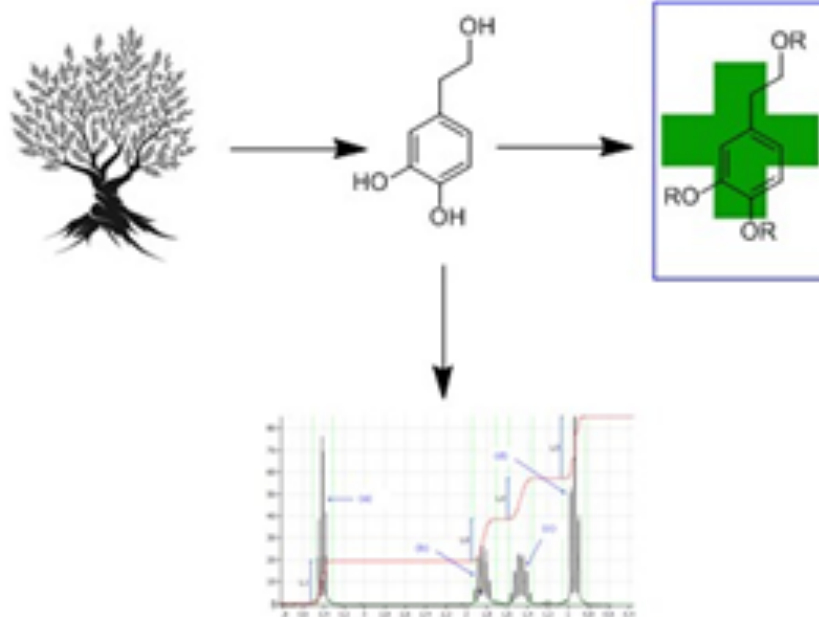
CAPÍTULO 6. SEMISYNTHESIS OF ω -HYDROXYALKYLCARBONATE DERIVATIVES OF HYDROXYTYROSOL AS ANTITRYPANOSOME AGENTS

6.1. INTRODUCTION	159
6.2. RESULTS AND DISCUSSION	160
6.3. EXPERIMENTAL SECTION	166
6.4. REFERENCES	173

CAPÍTULO 7. ESPECTROS RMN

7.1. ESPECTROS RMN PUBLICACIÓN 2	179
7.2. ESPECTROS RMN PUBLICACIÓN 3	187
7.3. ESPECTROS RMN PUBLICACIÓN 4	209

INTRODUCCIÓN



CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. GENERALIDADES DE PRODUCTOS NATURALES

Históricamente, la mayoría de los nuevos medicamentos han sido diseñados a partir de productos naturales (metabolitos secundarios) o de compuestos derivados de productos naturales. Durante los últimos 15 años, la investigación por parte de la industria farmacéutica centrada en los productos naturales ha fluctuado, debido a cuestiones como la falta de compatibilidad entre las bibliotecas tradicionales de extractos de productos naturales, con el cribado de alto rendimiento.¹ Aun así, en las tres últimas décadas el porcentaje de nuevos fármacos de origen natural patentados se ha mantenido entre el 25 y el 40 por ciento del total de fármacos en el mercado, en particular se ha incrementado el número de productos naturales o derivados producidos por microbios o por interacciones microbianas.²

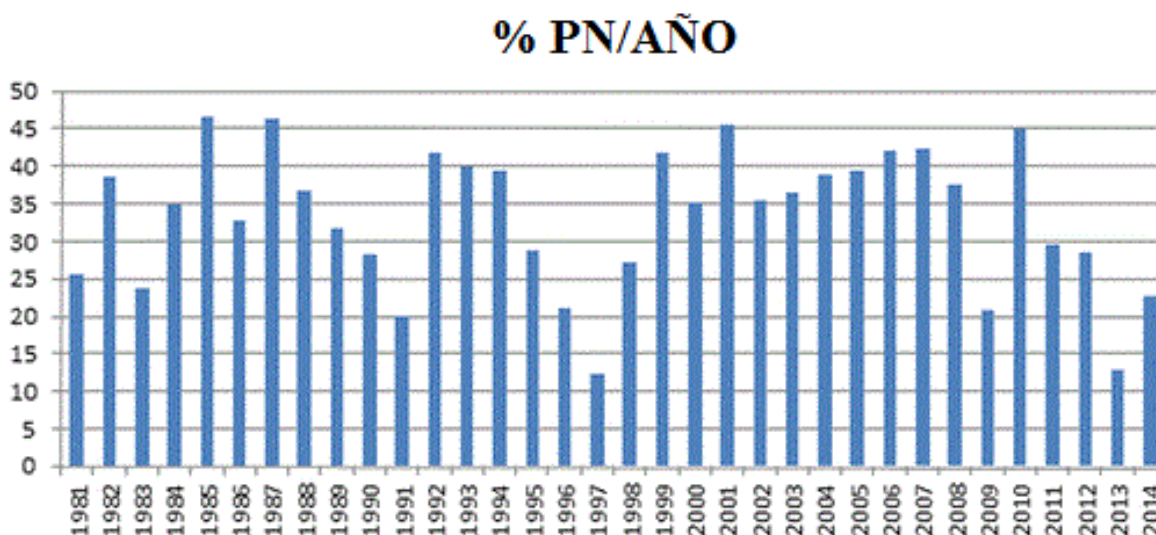


Figura 1.1. Gráfica detallada del porcentaje de fármacos de origen natural lanzados al mercado por año.

Aunque haya incrementado la obtención de productos de origen microbiano, el reino vegetal continúa siendo la principal fuente de nuevos agentes farmacológicos, ya que existen múltiples plantas medicinales. Se estima que cerca 10.000 de las 300.000 especies de plantas superiores identificadas tienen alguna actividad terapéutica. Los organismos del reino vegetal poseen una gran diversidad de metabolitos secundarios, y muchos de ellos presentan actividades terapéuticas, de los que hasta el momento sólo se han investigado una pequeña parte.³

(1) Li, J. W.-H.; Vederas, J. C. *Science*. **2009**, 325 (5937), 161–165.

(2) Newman, D. J., Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79 (3), 629–661.

(3) McChesney, J. D.; Venkataraman, S. K.; Henri, J. T. *Phytochemistry* **2007**, 68 (14), 2015–2022.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

De entre las distintas familias de productos naturales, los terpenos constituyen la más extensa, con más de 65.000 compuestos pertenecientes a esta clase, en esta familia se encuentran compuestos con actividades farmacológicas importantes, como son los esteroides, glucósidos cardiacos, saponinas y terpenos modificados. Debido a su extenso campo de aplicación, representan un grupo de suma importancia económica lo que permite que se sigan buscando e identificando nuevas estructuras.⁴ En plantas, los terpenoides intervienen en distintos procesos funcionales, como son reguladores de crecimiento vegetal (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos fotosintéticos (carotenoides y fitol), portadores de electrones (ubiquinona y plastoquinona) y componentes estructurales de membrana. Además de estas funciones metabólicas, funcionales y estructurales, muchos terpenoides intervienen en la comunicación y defensa de las plantas, como atrayentes de polinizadores o de dispersores de semillas, también actuando como fitoalexinas competitivas, antibióticos y toxinas repelentes.⁵

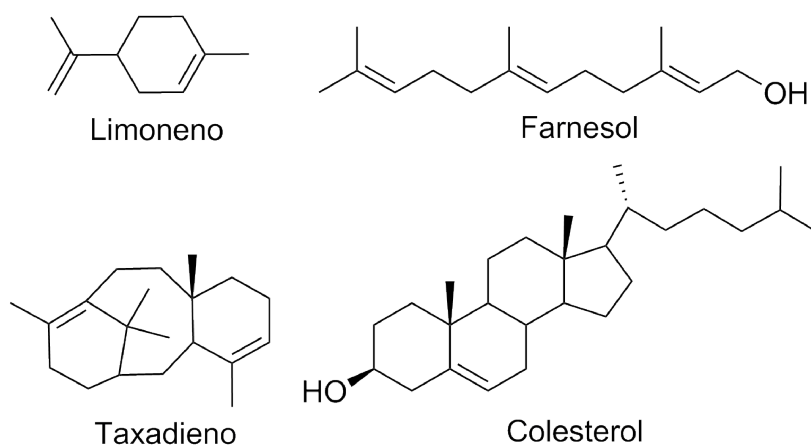


Figura 1.2. Distintas estructuras de los terpenos.

Por otro lado, se han identificado más de 8.000 compuestos polifenólicos en diversas especies de plantas. Todos los compuestos fenólicos vegetales surgen a través de dos rutas conocidas como, ruta de ácido shikímico y la ruta de acetato malonato o también nombrada ruta de los policétidos. Principalmente estos compuestos se presentan en formas conjugadas, normalmente con uno o varios residuos de azúcar unidos a grupos hidroxilo, aunque se pueden dar enlaces directos del azúcar (polisacárido o monosacárido) con un carbono aromático. Tampoco es extraña la asociación de polifenoles con otros compuestos, como lípidos o conjugados con otros fenoles.⁶ Los polifenoles desempeñan un papel clave en el crecimiento, la regulación y la estructura de las plantas. Tanto los fenoles naturales como los polifenoles más grandes son sumamente importantes en la ecología de la mayoría de las plantas.

(4) Oldfield, E., & Lin, F.-Y. *Angew. Chem.* **2012**, 51(5), 1124–1137.

(5) Harborne, J. B. (Jeffrey B.), Tomas-Barberan, F. A. (Francisco A. and P. S. of E. *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids.*; **1991**.

(6) Pandey, K. B.; Rizvi, S. I. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2009**, 2 (5), 270–278.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los efectos de estos compuestos en los tejidos vegetales son muy diversos. Los polifenoles participan en la liberación y supresión de hormonas como las auxinas, protegen contra la radiación ionizante formando pantallas UV y proporcionando coloración (pigmentos vegetales), ayudan a la disuasión de herbívoros (propiedades sensoriales), previenen de infecciones microbianas (fitoalexinas) o sirven en la señalización de moléculas en la maduración y otros procesos de crecimiento.^{7,8} Los polifenoles simples se clasifican de acuerdo al número de anillos fenólicos que poseen en su estructura y de los elementos estructurales que interconectan unos con otros a estos anillos. Los grupos principales son: flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, lignanos y estilbenos.

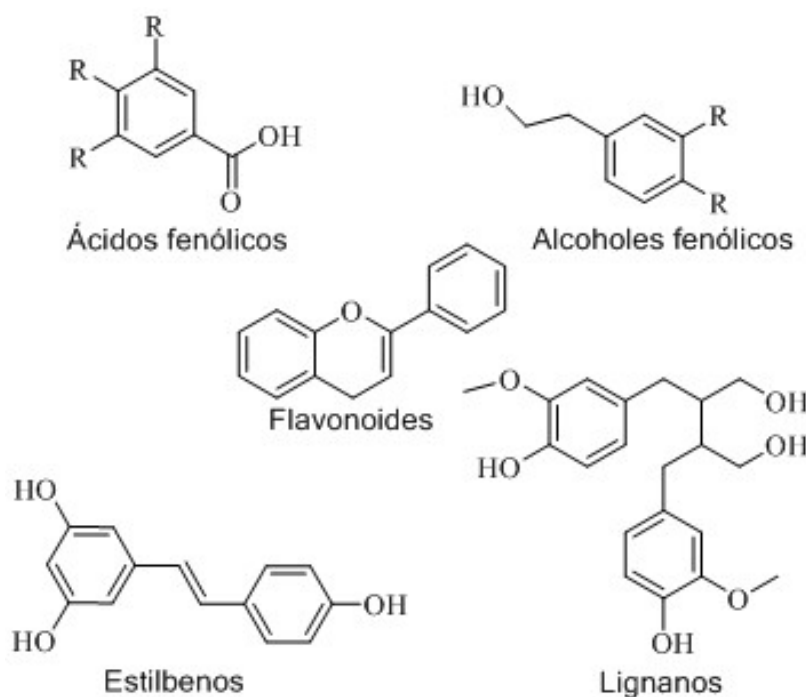


Figura 1.3. Distintas estructuras de los polifenoles.

(7) Huber, B.; Eberl, L.; Feucht, W.; Polster, J. *Z Naturforsch* **2003**, *58* (11-12), 879–884.

(8) Lattanzio, V.; Lattanzio, V. M. T.; Cardinali, A.; Amendola, V. *Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects*; **2006**; Vol. 661.

1.2. BIOGÉNESIS

1.2.1. Biogénesis de los Ácidos Maslínico y Oleanólico

Ya el siglo XIX algunos científicos se empezaron a interesar por los triterpenos, pero no fue hasta la década de los cincuenta del siglo pasado cuando el premio nobel Leopold Ružička inició las investigaciones sobre su estructura. Basándose en una amplia información estructural, Ružička fue capaz de racionalizar la biogénesis de terpenoides y desarrollarla mediante la regla biogenética del isopreno.⁹ La correlación entre todas las estructuras terpénicas tienen como origen la ruta biogenética de isopreno, la cual ha dado lugar a numerosos trabajos. Los terpenos se clasifican, según el número de unidades de isopreno (5 carbonos, 2-metil-1,3-butadieno) que posee su esqueleto hidrocarbonado, en monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), sesterterpenos (5 unidades), triterpenos (6 unidades) y tetraterpenos (8 unidades).

Los triterpenos es el grupo más abundante de los terpenos, a pesar de ello todos se forman desde un único precursor, escualeno, un alcohol triterpénico generado por condensación cola-cola del sesquiterpeno farnesol. Debido al número de carbonos de su estructura este grupo presenta una gran diversidad estructural pudiendo además encontrarse las moléculas en estado libre, o bien formando glicósidos o como ésteres. Los triterpenos se hallan repartidos en todo el reino vegetal, aunque también han sido descubiertos algunos triterpenos muy importantes en el reino animal. Entre estos triterpenos de origen animal se incluyen el anteriormente citado escualeno, cuyo nombre ya hace fácil imaginar que fue aislado por primera vez del aceite de hígado de tiburón, en mamíferos también hay un gran número de triterpenos ciclados como lanosterol, que se encuentra en la lana de las ovejas y que es un precursor de colesterol.

En el reino vegetal, la biosíntesis de terpenos comienza en el citosol con ácido mevalónico (ácido (R)-3,5-dihidroxi-3-metilpentanoico) como base, este compuesto se da por condensación de tres unidades de acetyl-CoA. Primero actúa una enzima conocida como acetyl-coenzima A acetyltransferasa (o tiolasa) que cataliza la unión de dos unidades de acetyl-CoA mediante reacción de Claisen, generando acetoacetyl-CoA. Después la hidroximetilglutaril-CoA sintasa, o abreviada HMG-CoA sintasa, es la enzima responsable de una segunda condensación de acetyl-CoA con el acetoacetyl-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Consecutivamente, se suceden dos reacciones, la activación por fosforilación seguida de la descarboxilación de ácido mevalónico como indica la figura 1.3. De este modo queda formado pirofosfato de 3-isopentenilo, que logra isomerizar a pirofosfato de γ,γ -dimetilalilo (pirofosfato de 2-isopentenilo), ambos productos que muestran una gran actividad en reacciones de sustitución nucleofílica.

(9) Ruzicka, L. *Experientia* **1953**, 9 (10), 357–367.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

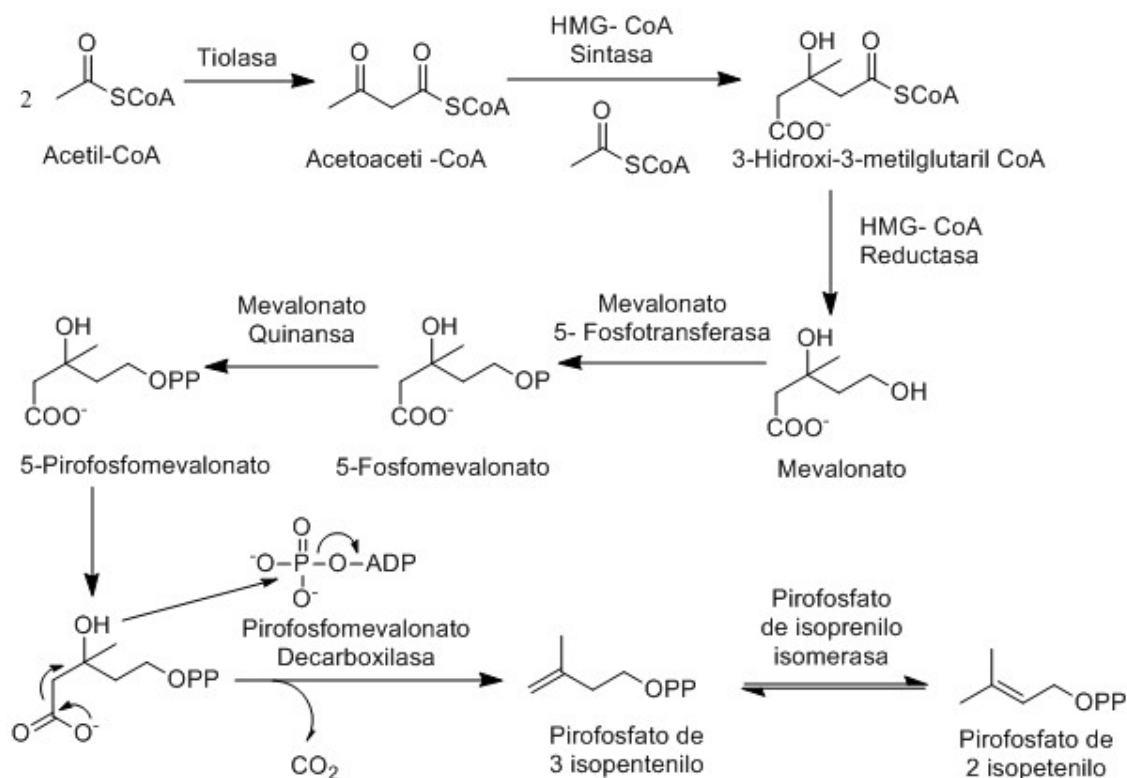


Figura 1.4. Biosíntesis de los precursores biológicos de los terpenos (pirofosfato de 3-isopentenilo y pirofosfato de 2-isopentenilo).

La formación del primer monoterpene se da cuando pirofosfato de 3-isopentenilo defosforila a pirofosfato de 2-isopentenilo produciéndose por unión cabeza-cola, pirofosfato de geranilo, el primer monoterpene lineal. Este primer monoterpene, puede reaccionar o ciclar para genera un gran número de esqueletos de diez carbonos, denominados monoterpene (pineno, mirceno, mentol, etc.), dándose compuestos lineales y de uno o dos ciclos. Debido a la acción de la enzima geranil transferasa una molécula de pirofosfato de geranilo se une a pirofosfato de 3-isopentenilo, esto produce pirofosfato de farnesilo, que constituye la base de todos los sesquiterpene, en esta familia la variedad de productos es tan grande que se dan hasta compuestos de tres ciclos (humulano, drimano, eudesmanos, etc.). Nuevamente para la síntesis de todos los diterpene se debe dar la unión cabeza cola de farnesil pirofosfato con pirofosfato de 3-isopentenilo, esta unión da geranil-geraniol y sus derivados (kauranos, beyeranos, atisanos, etc.). Por último, la síntesis de escualeno se da mediante la unión cola-cola de dos moléculas de pirofosfato de farnesilo catalizada por la enzima escualeno sintasa, que como ya se comento es precursor de todas las estructuras triterpénicas (dammarano, lupano, oleanano, ursano, etc.). (Figura 1.6.)

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

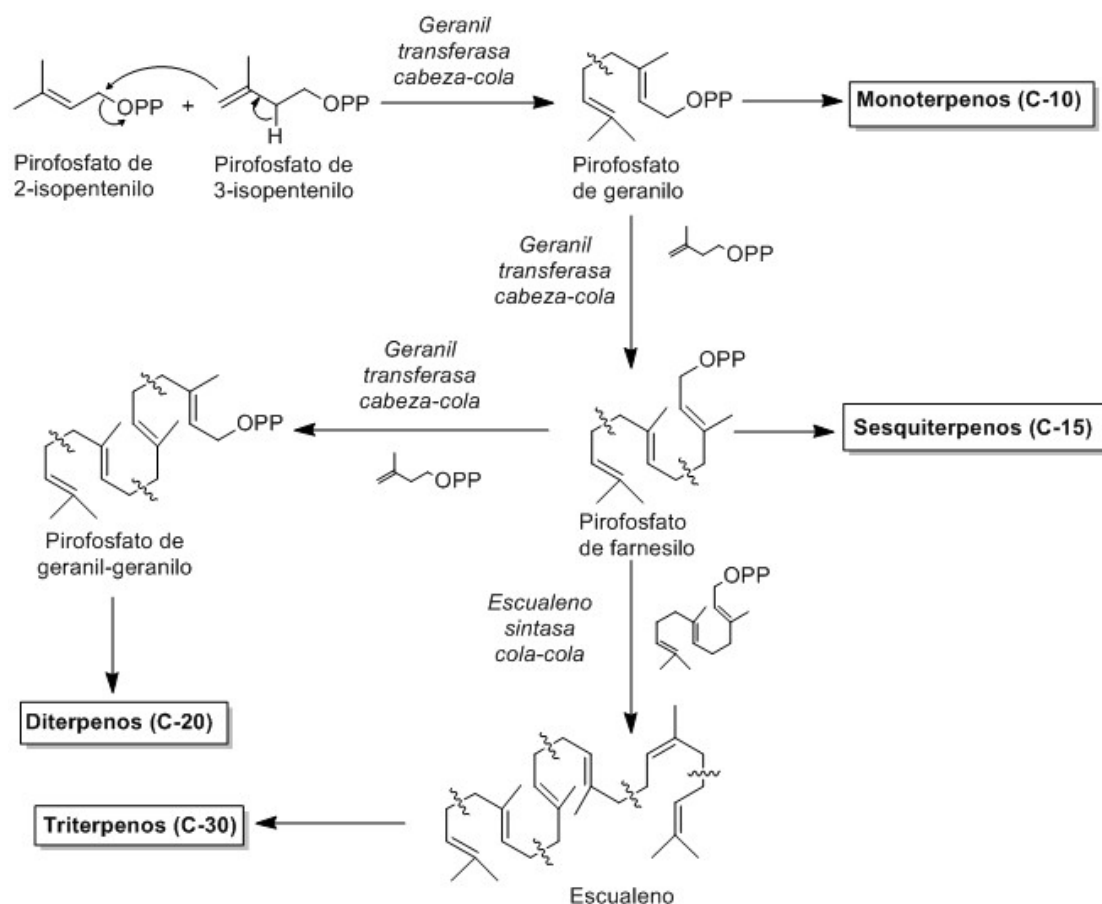


Figura 1.5. Rutas biogénicas hacia mono, sesqui, di y triterpenos a partir de sus precursores (pirofosfato de 2-isopentenilo y pirofosfato de 3-isopentenilo).

Cuando se da la oxidación de uno de los dobles enlaces terminales de escualeno proporciona el susodicho óxido de escualeno, que puede sufrir una ciclación controlada por enzimas. La apertura de este epóxido genera un carbocatión, y la presencia de los dobles enlaces de la molécula permite la transposición de esta carga positiva, generando una estructura tetracíclica con carga positiva con esqueleto de dammarano, precursor de todos los esteroides. Para que la reacción concluya en esta estructura, la molécula debe ser plegada en la conformación silla-silla-silla-bote. Las subsiguientes transposiciones de Wagner-Meerwein modifican el anillo de cinco miembros a uno de seis y añaden un nuevo anillo, generando así el resto de las estructuras de triterpenos pentacíclicos (oleanano, ursano, lupano, hopano...).

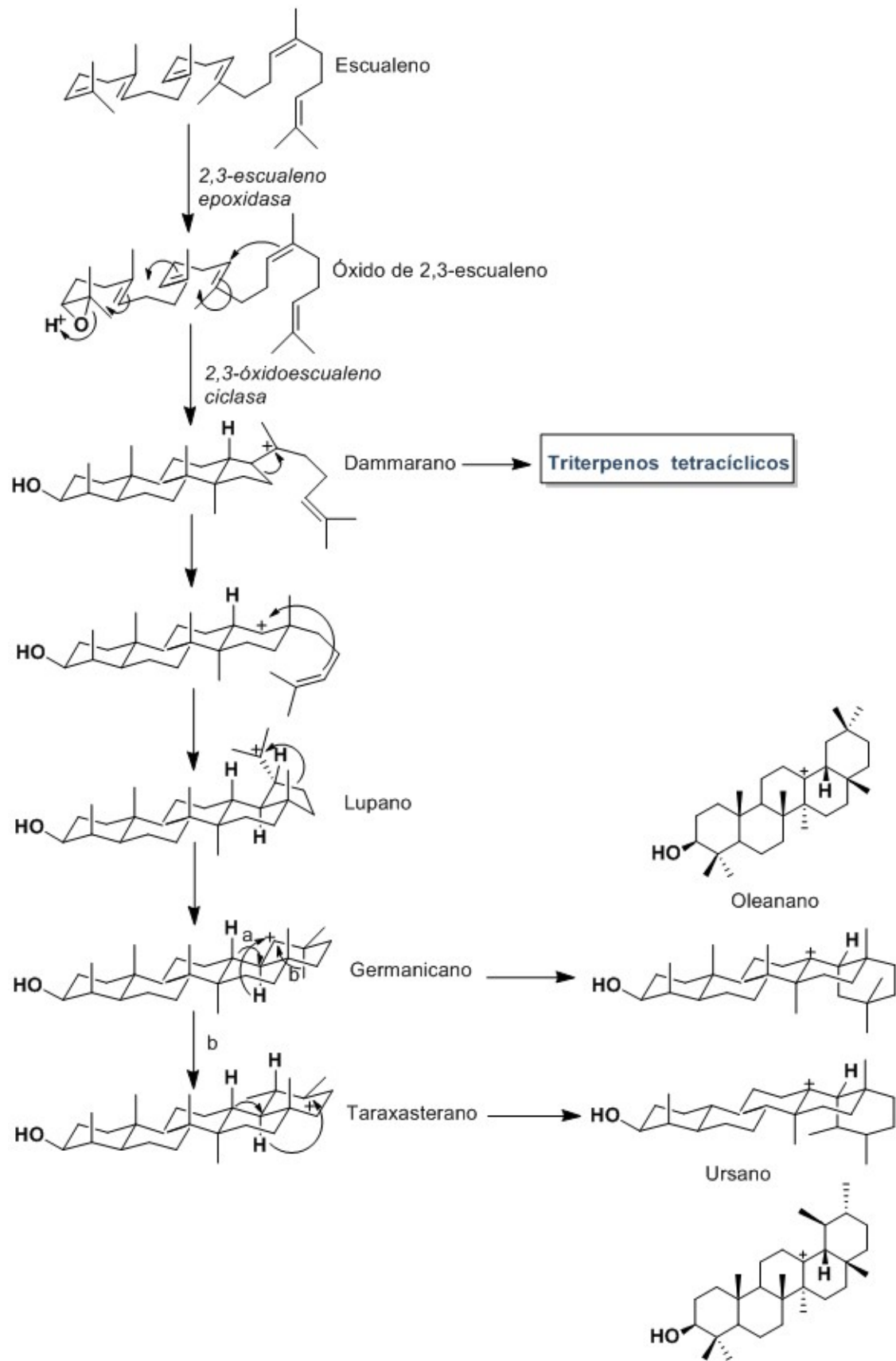


Figura 1.6. Biogénesis de triterpenos a partir de Óxido de Escualeno.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Por tanto, el 2,3-óxido de escualeno es el precursor tanto de los primeros esteroides naturales (lanosterol y cicloartenol) como de los triterpenos pentacíclicos de los que se forman ácido maslínico y oleanólico. Para la formación de cicloartenol en plantas, la ciclación transcurre a través de la cicloartenol sintasa (CAS), mientras que en el reino animal y de los hongos, el lanosterol se forma mediante la enzima lanosterol sintasa (LSS). Puede considerarse que la CAS, es la enzima ancestral de todas las óxido-escualeno ciclasas existentes hoy en día involucradas en el metabolismo secundario de las plantas.

Para la síntesis biogénica de ácido oleanólico, el 2,3-óxido de escualeno debe ser ciclado hasta β -amirina, esta reacción se da mediante la enzima β -amirina sintasa (BAS).¹⁰ Posteriormente se deben dar una serie de oxidaciones, con enzimas de la familia de citocromo P450, sobre el metilo C-28, estas oxidorreductasas son conocidas como CYP716A.^{11,12} Como se muestra el primer derivado oxidado es un alcohol primario llamado eritrodil, que posteriormente pasa a aldehído y por último a ácido oleanólico. La formación de ácido maslínico debe venir de la oxidación del C-2 a alcohol pero, la enzima o enzimas que se suponen participan en la formación de este derivado no se han discernido hoy en día.

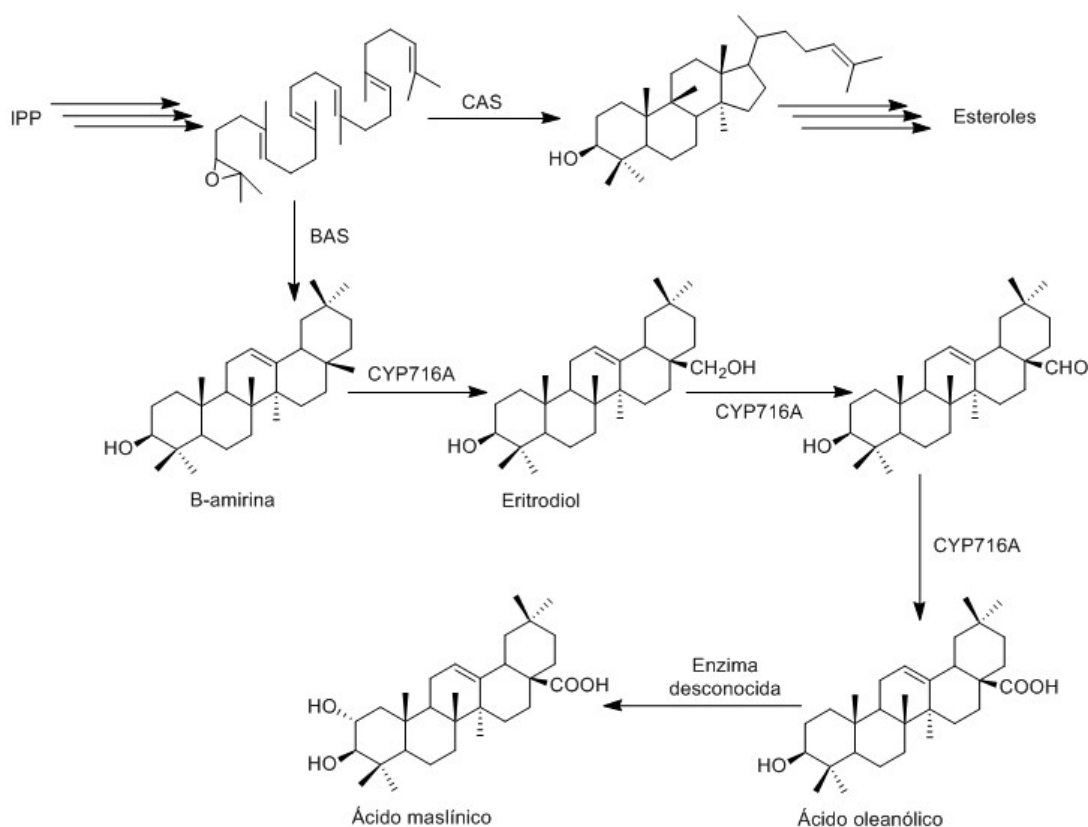


Figura 1.7. Formación del ácido oleanólico.

(10) Corey, E. J.; Matsuda, S. P.; Bartel, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91* (6), 2211–2215.

(11) Carelli, M.; Biazzi, E.; Panara, F.; Tava, A.; Scaramelli, L.; Porceddu, A.; Graham, N.; Odoardi, M.; Piano, E.; Arcioni, S.; May, S.; Scotti, C.; Calderini, O. *Plant Cell* **2011**, *23* (8), 3070–3081.

(12) Gil, M.; Haïdour, A.; Ramos, J. L. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (97), 4490–4494.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Durante la maduración del fruto del olivo, aproximadamente transcurridas 14 semanas de su floración, los análisis determinan que la presencia de α - y β -amirina es bastante significativa estando en proporción 3:2, también se encuentran otros triterpenos mas oxigenados, tanto en forma de éteres metílicos como de ácidos carboxílicos. La presencia de otros triterpenos no esteroideos acilados es muy pequeña en esta etapa de maduración, representando solo el 2% de los metabolitos libres. De aquí se deduce que practicante toda las recién sintetizadas α - y β -amirina son metabolizadas en ácidos y dioles. Estas reacciones podrían darse en los tejidos externos de la aceituna que se encuentran expuestos a la luz del sol, esto ocurre entre la semana 22 y 31 de la maduración. En este periodo de tiempo se da la acumulación de ácido maslínico el cual en el fruto maduro ronda el 60% de los triterpenos totales, este fenómeno corrobora que en primer lugar se da la oxidación a ácido del carbono metílico de C-28 y después se da la hidroxilación del C-2. A modo de curiosidad, cabe resaltar que a pesar de que α -amirina estaba presente en una mayor ratio que β -amirina, los compuestos de esqueleto oleanano se producen en mayores cantidades que los compuestos con esqueleto de ursano. Así pues, los principales triterpenos pentacíclicos presentes son, en forma de ácido los ácidos oleanólico y maslínico que representan el 99% de los ácidos terpénicos y como alcohol terpénico eritrodiol representa alrededor del 60% de los dialcoholes triterpénicos. La ruta metabólica en la cual se consume α -amirina en la aceituna aún no se ha dilucidado. Pasada la semana 30 del florecimiento del fruto, decae la concentración de todos los terpenos pentacíclicos presentes en el fruto, los cuales son dirigidos muy probablemente hacia las rutas que componen los terpenos más complejos saponificables.

Conocidas las enzimas y precursores involucrados, la ingeniería genética están permitiendo la obtención de ácido oleanólico y derivados a través de la expresión de los genes biogenéticos de plantas en diversas cepas como son *Escherichia coli* o levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*), lo que reduce bastante el inconveniente de la baja concentración in planta de estos compuestos.¹³

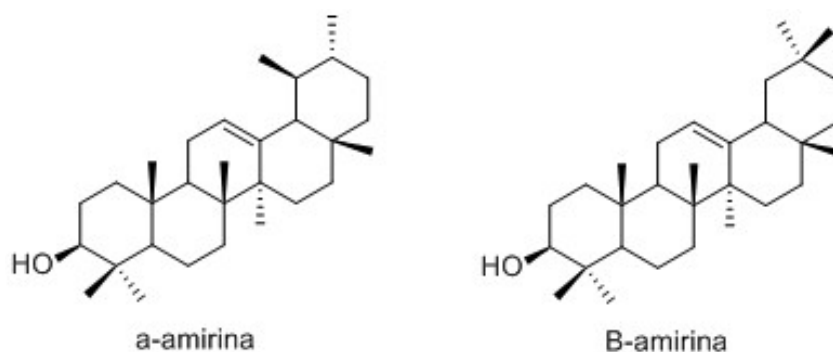


Figura 1.8. Estructuras de amirinas.

(13) Pollier, J.; Moses, T.; Goossens, A. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28 (12), 1897.

1.2.2. Biogénesis de Polifenoles

Las células vegetales (cloroplastos) fijan el dióxido de carbono a través del ciclo de Calvin en gliceraldehído-3-fosfato, el cual puede transformarse y acumularse como carbohidratos de almacenamiento tales como sacarosa y almidón. Cuando es necesario estos azúcares se pueden degradar siguiendo dos posibles vías bien por glicolisis (produciendo: gliceraldehído-3-fosfato, fosfoenolpiruvato y piruvato) o a través de la vía oxidativa de pentosa fosfato (produciendo: eritrosa-4-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato).

El gliceraldehído-3-fosfato tiene un papel especial, ya que puede obtenerse por las dos rutas de degradación metabólica de carbohidratos dependiendo de la demanda, bien puede reaccionar hasta piruvato para ser usado en la ruta acetato-malonato, o reaccionar hasta fosfoenolpiruvato para seguir la ruta de shikimato. Ambas vías son esenciales para la biosíntesis de polifenoles. Si se dirigen niveles significativos de fosfoenolpiruvato para la vía shikimato (junto con eritrosa-4-fosfato), conlleva que la producción de piruvato para las necesidades de la vía acetato-malonato se reduzca significativamente.¹⁴

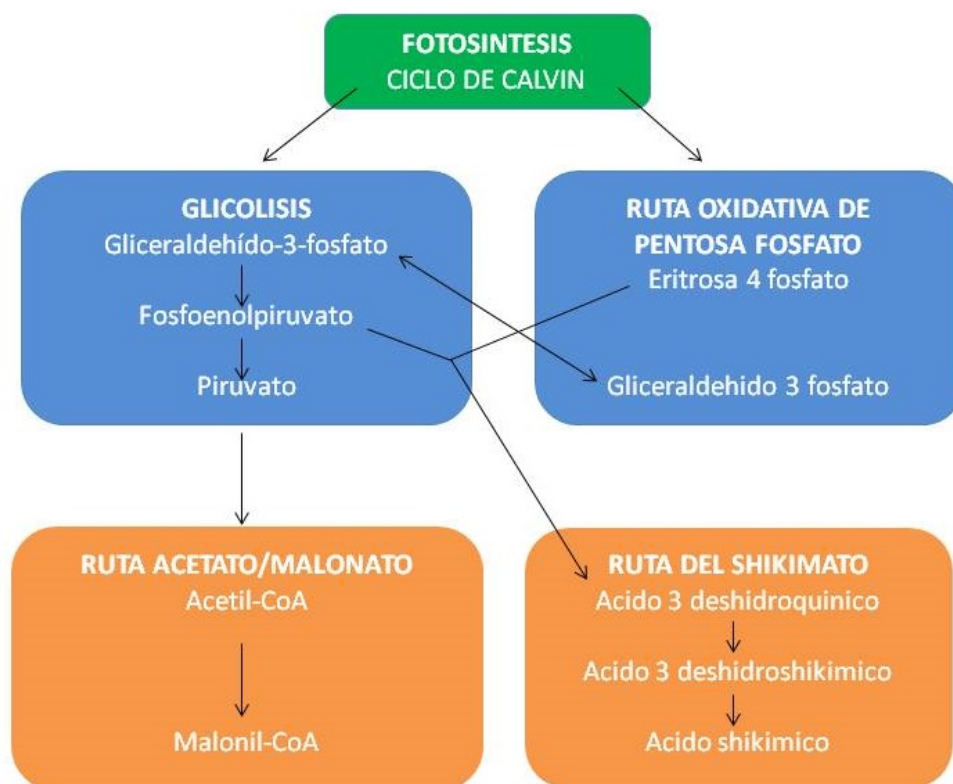


Figura 1.9. Rutas principales para la síntesis de polifenoles.

(14) Salminen, J. P.; Karonen, M. *Funct. Ecol.* **2011**, 25 (2), 325–338.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La ruta de acetato malonato conduce a polifenoles derivados de policétidos como flavonoides y estilbenos como resveratrol.¹⁵ Como se puede observar en la figura 1.10 para la síntesis de resveratrol es necesario también ácido p-cumárico sintetizado en la ruta de shikímico a partir de tirosina.

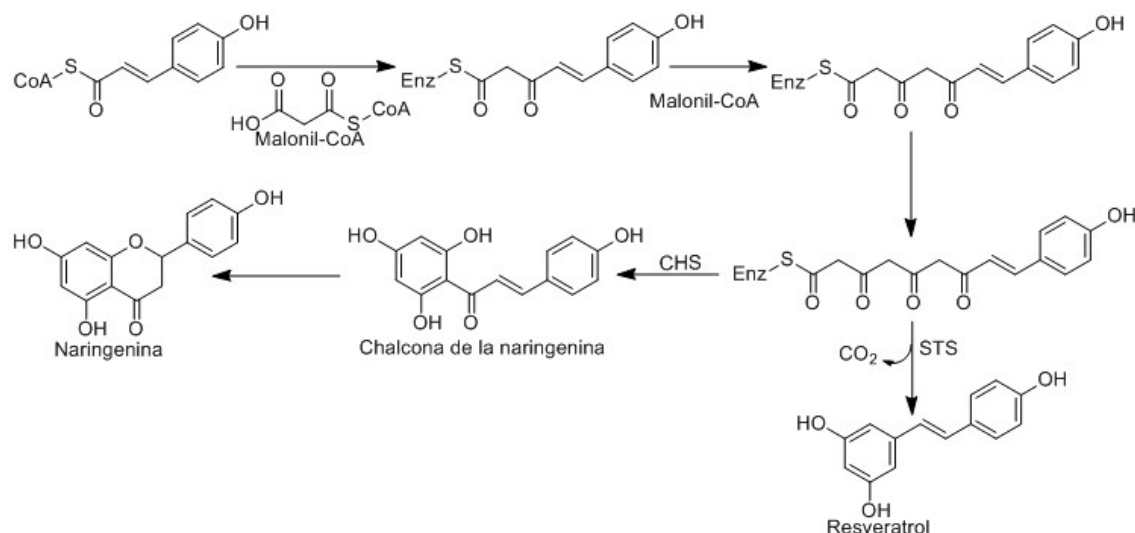


Figura 1.10. Síntesis de resveratrol y ciclación de flavonona.

Por otro lado la ruta de shikímico se inicia, como indica la figura 1.11, con la reacción aldólica entre fosfoenolpiruvato y eritrosa 4-fosfato para formar el precursor DAHP, el cual a través de reacciones de desfosforilación, deshidratación y reducción se obtiene ácido shikímico.¹⁶

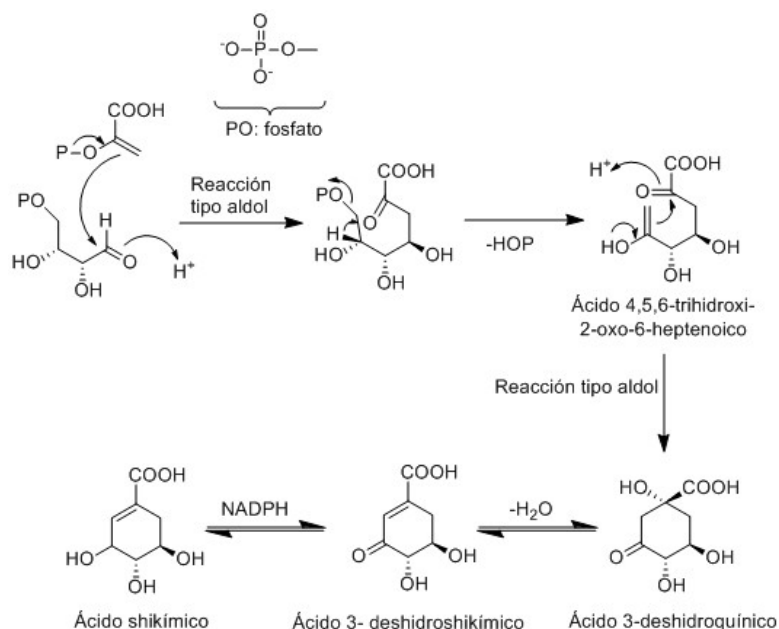


Figura 1.11. Síntesis de ácido shikímico.

(15) Yu, D.; Xu, F.; Zeng, J.; Zhan, J. *IUBMB Life* **2012**, *64* (4), 285–295.

(16) Rosa María Claramunt Vallespi, María Angeles Farrán Morales, Concepción López García, Marta Pérez Torralba, M. D. S. M. G. *Química bioorgánica y productos naturales*; **2013**.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Una vez formado ácido shikímico, se produce una fosforilación vía ATP seguida de la adición de una molécula de fosfoenolpiruvato que subsecuentemente desfosforila generando ion corismato, este ion bien puede dar una transposición de Claisen y formar prefenato (precursor de tirosina y fenilalanina) o seguir una ruta alternativa para formar triptófano.¹⁷

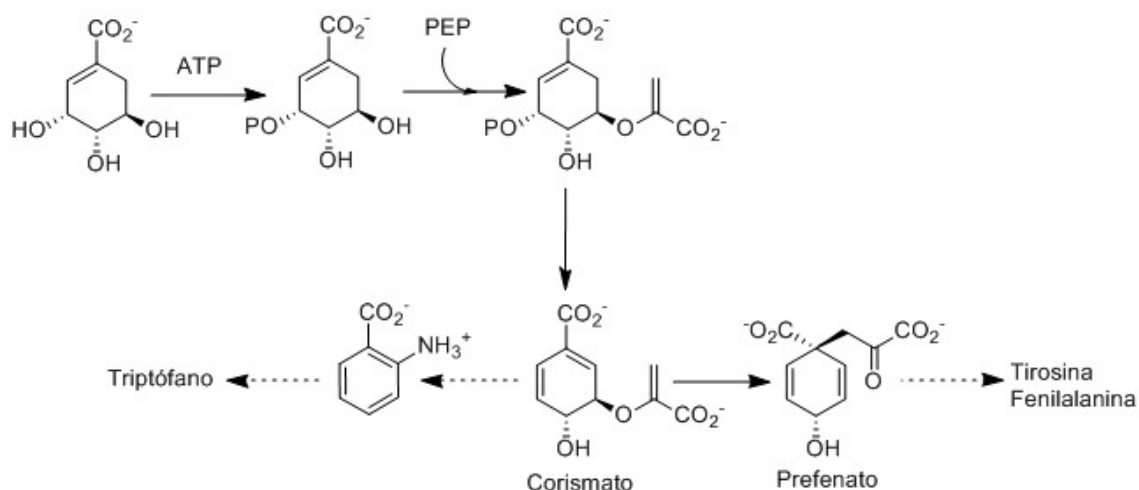


Figura 1.12. Separación de las rutas biosintéticas de los aminoácidos aromáticos.

La síntesis de fenilalanina transcurre por un intermedio llamado argenato que se forma debido a la aminación del carbonilo del prefenato mediante a la enzima prefenato amino transferasa (PAT) posteriormente la argenato deshidratasa (ADT) completa la síntesis de fenilalanina.¹⁸

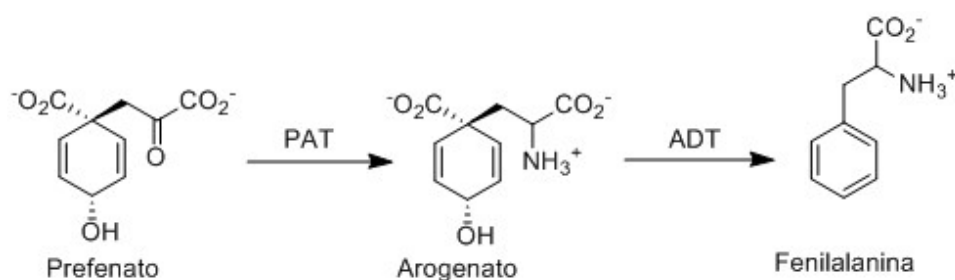


Figura 1.13. Paso final de la biosíntesis de fenilalanina.

(17) Knaggs, A. R. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20 (1), 119–136.

(18) Tohge, T.; Watanabe, M.; Hoefgen, R.; Fernie, A. R. *Front. Plant Sci.* **2013**, 4 (March), 1–13.

La síntesis de tirosina transcurre mediante un intermedio llamado 4-hidroxifenil piruvato que se forma por descarboxilación de prefenato por acción de la enzima prefenato deshidrogenasa posteriormente la enzima ácido glutámico transaminasa completa la síntesis de tirosina. Los mamíferos podemos sintetizar tirosina partiendo de fenilalanina, esta conversión es catalizada por monooxigenasa fenilalanina hidroxilasa.

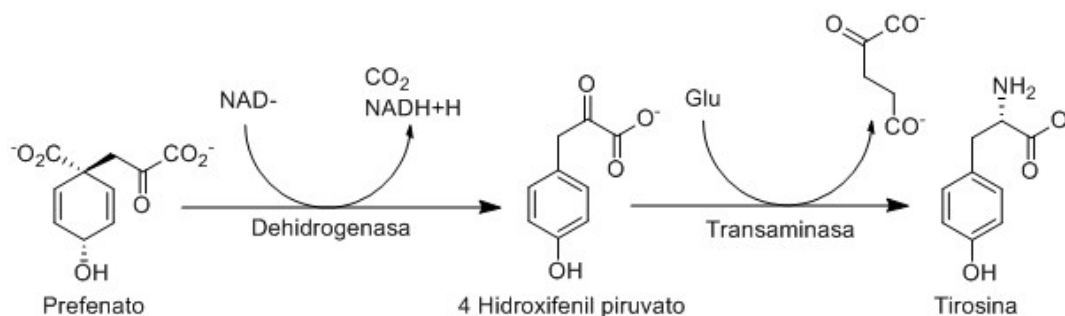


Figura 1.14. Paso final de la biosíntesis de tirosina.

Desde tirosina se sintetizan los tres fenoles principales de este trabajo, tirosol, levodopa e hidroxitirosol, siendo este último producido por dos vías, una partiendo de levodopa y la otra desde tirosol.¹⁹ La enzima tirosina hidroxilasa o tirosina 3-monooxigenasa es responsable de catalizar la conversión de tirosina a dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Levodopa o L-DOPA por reacción con la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa produce dopamina, que por acción de dos enzimas una monooxigenasa y una aldehído reductasa genera hidroxitirosol.²⁰

La formación de tirosol transcurre mediante la reacción de tirosina con tirosina decarboxilasa dando tiramina que al igual que dopamina es sustrato de dos enzimas primero de una monooxigenasa y después una aldehído reductasa que produce tirosol.²¹ Para formar hidroxitirosol es necesaria una monooxigenasa.²²

(19) Saimaru, H.; Orihara, Y. *J. Nat. Med.* **2010**, *64* (2), 139–145.

(20) Pérez-Mañá, C.; Farré, M.; Pujadas, M.; Mustata, C.; Menoyo, E.; Pastor, A.; Langohr, K.; De La Torre, R. *Pharmacol. Res.* **2015**, *95-96*, 27–33.

(21) Johnson, C. H.; Patterson, A. D.; Krausz, K. W.; Kalinich, J. F.; Tyburski, J. B.; Kang, D. W.; Luecke, H.; Gonzalez, F. J.; Blakely, W. F.; Idle, J. R. *Radiat. Res.* **2012**, *178* (4), 328–340.

(22) Liebgott, P. P.; Amouric, A.; Comte, A.; Tholozan, J. L.; Lorquin, J. *Res. Microbiol.* **2009**, *160* (10), 757–766.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

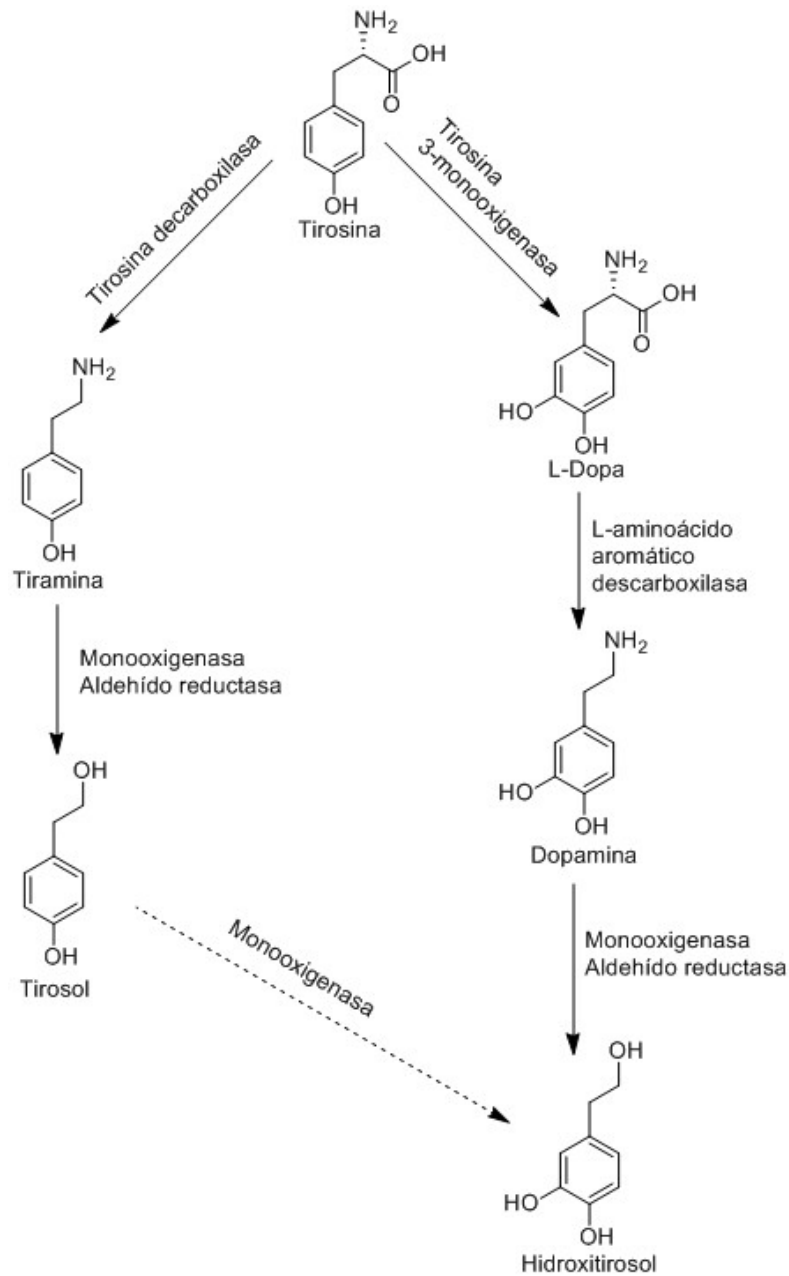


Figura 1.15. Síntesis de tirosol, levodopa e hidroxitirosol.

1.3. FUENTES DE PRODUCTOS NATURALES

1.3.1. Fuentes Naturales de los Ácidos Maslínico y Oleanólico

Los ácidos oleanólico (ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico) y maslínico (ácido 2 α ,3 β -dihidroxi-12-oleanen-28-oico, AM) son dos compuestos triterpenoides pentacíclicos presentes de manera apreciable en todo el reino vegetal habiendo sido aislados en más de 1620 especies de plantas incluyendo muchas plantas alimentarias y medicinales.²³ Ambos compuestos son especialmente abundantes en plantas pertenecientes a la familia Oleaceae, entre las cuales se encuentra el olivo (*Olea europaea*), la especie vegetal de la cual viene el nombre de ácido oleanólico.²⁴

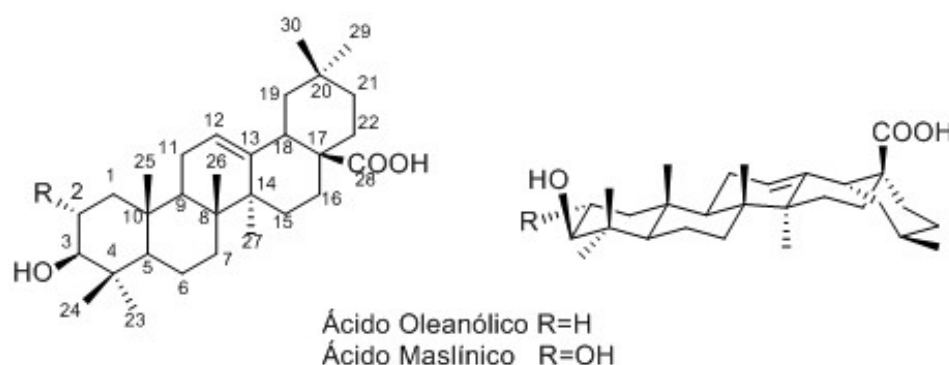


Figura 1.16. Representación plana y espacial de los ácidos oleanólico y maslínico.

En la naturaleza, estos compuestos existen ya sea como ácidos libres o pueden estar unidos a una o más cadenas de azúcar. Los ácidos oleanólico, maslínico y sus derivados poseen varias actividades farmacológicas prometedoras, tales como efectos hepatoprotectores, y actividades antiparasitarias, antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas, incluso derivados de estos ácidos tienen propiedades frente HIV.^{25,26}

Si bien ácido oleanólico se comercializa principalmente procedente de los hidrolizados de ginseng, de ácido maslínico no existen fuentes comerciales ya que está mucho menos repartido en el reino vegetal. Ácido oleanólico fue aislado por primera vez en 1908 de las hojas de la aceituna por Frederick B. Power, denominándolo oleanol.²⁷ En 1924, van der Haar propone el cambio de nombre a ácido oleanólico revisando su estructura.²⁸

(23) Fukushima, E. O.; Seki, H.; Ohyama, K.; Ono, E.; Umemoto, N.; Mizutani, M.; Saito, K.; Muranaka, T. *Plant Cell Physiol.* **2011**, *52* (12), 2050–2061.

(24) Sporn, M. B.; Liby, K. T.; Yore, M. M.; Fu, L.; Lopchuk, J. M.; Gribble, G. W. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (3), 537–545.

(25) Pollier, J.; Goossens, A. *Phytochemistry* **2012**, *77*, 10–15.

(26) Parra, A.; Martín-Fonseca, S.; Rivas, F.; Reyes-Zurita, F. J.; Medina-O'Donnell, M.; Martínez, A.; García-Granados, A.; Lupiáñez, J. A.; Albericio, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 278–301.

(27) Power, F. B.; Tutin, F. *J. Chem. Soc. Trans.* **1908**, *93* (0), 891–904.

(28) van der Haar, A. W. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas* **1924**, *43* (8), 548–549.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En 1931, Wedekind aísla un triterpeno de la corteza del guaiac o guayaco (*Guaiacum officinale*), al que denomina guagenina y que Alfred Winterstein lo identifica como ácido oleanólico.²⁹ De esta forma, ácido oleanólico tiene un gran número de sinónimos (oleanol, guagenina, taragenina, ácido víscico, ácido oleánico, etc.).

En cambio, no es hasta 1960 cuando Luciano Caglioti aisló un nuevo ácido triterpénico a partir de la pulpa de la aceituna al que denominó ácido maslínico³⁰, que resultó ser ácido cratególico, aislado anteriormente por Rudolf Tschesche, en 1951 a partir de un extracto de las hojas del espino (*Crataegus oxyacantha*).³¹ Aunque de forma menos extendida, se encuentra distribuido en la naturaleza como tal o bien en forma de éster metílico o formando distintos tipos de glicósidos. Asimismo, es posible aislar este ácido del lúpulo, la menta, el granado, la salvia, el clavo o el azufaifo.

Algunos triterpenos en su forma libre, como es el caso del ácido oleanólico, suele encontrarse a menudo en la cera epicuticular de las plantas y ésta, no solo impermeabiliza la epidermis, repeliendo el agua además evita la adhesión de conidios y esporas de agentes patógenos, es decir que también constituye un medio de defensa.³² De esta forma, en las hojas del olivo, el ácido oleanólico se encuentra formando casi cristales puros que forman una barrera física frente al ataque fúngico. Sin embargo, no sólo se encuentra como ácido libre sino que también constituye el aglicón de ciertas saponinas triterpénicas uniéndose a una o a varias moléculas de azúcar. En plantas, estas moléculas de ácido oleanólico glicoconjugadas pueden actuar como compuestos de defensa frente a herbívoros o patógenos, o como agentes alelopáticos.³³

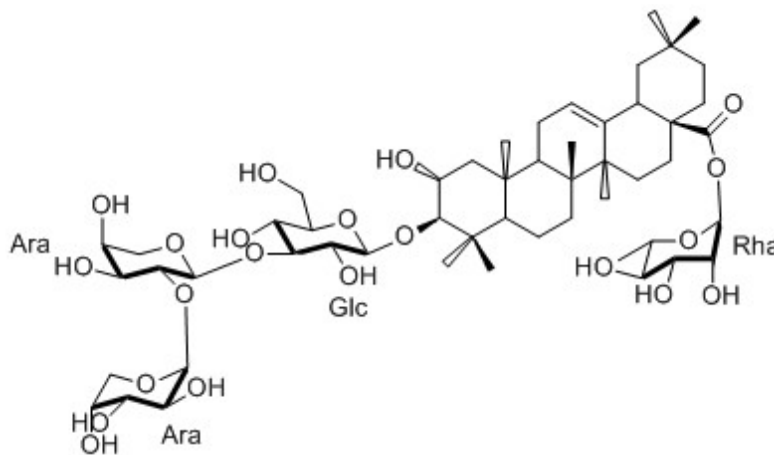


Figura 1.17. Glicósido de ácido maslínico aislado de la corteza de *Cylicodiscus gabunensis*.

(29) Hoppe-Seyler's *Zeitschrift für physiologische Chemie*. **1931**, p 132.

(30) Caglioti, L.; Cainelli, G. **1962**, *18* (1961), 1960–1961.

(31) Tschesche, R.; Heesch, A.; Fugmann, R. *Chem. Ber.* **1953**, *86* (5), 626–629.

(32) Heinzen, H.; de Vries, J. X.; Moyna, P.; Remberg, G.; Martinez, R.; Tietze, L. F. *Phytochem. Anal.* **1996**, *7* (5), 237–244.

(33) Wang, C.-M.; Chen, H.-T.; Li, T.-C.; Weng, J.-H.; Jhan, Y.-L.; Lin, S.-X.; Chou, C.-H. *J. Chem. Ecol.* **2014**, *40* (1), 90–98.

1.3.2. Fuentes Naturales de Tirosol e Hidroxitirosol

Parte del trabajo que se expone en esta Memoria aprovecha como materia prima, tirosol e hidroxitirosol que son aislados de los residuos sólidos de la molturación de la aceituna por cualquiera de los tres procedimientos usados actualmente (prensas, continuo en dos fases y en tres fases). El método empleado para aislar y purificar estos productos a partir de la fuente natural se detallará en el capítulo 3 expuesto en esta Memoria. Hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol, HTy) y tirosol (2-(4-hidroxifeniletanol), Ty) (figura 1.18) son dos productos naturales de origen fenólico, que se encuentran en grandes cantidades principalmente en la oliva aunque también se pueden encontrar abundantemente en el vino³⁴, así como en las hojas de aligustre.^{35,36}

En la naturaleza, estos compuestos existen ya sea como alcoholes libres o pueden estar unidos a un aglicón y esta a su vez unida a una o más cadenas de azúcar. Hidroxitirosol y sus derivados poseen varias actividades farmacológicas prometedoras, tales como efectos hipotensos, y actividades antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas, antiparasitarias e incluso algunos derivados tienen efectos antivirales.³⁷ Entre 1958-1965, Panizzi y sus colaboradores aislaron por primera vez oleuropeína, un glucósido amargo de presente en el olivo que exhiben actividad hipotensora. En presencia de β -glucosidasa, la oleuropeína se hidrolizó produciendo una aglicón y glucosa. La estructura química del aglicón (HTy) se demostró mediante la formación de algunos derivados cristalinos.³⁸

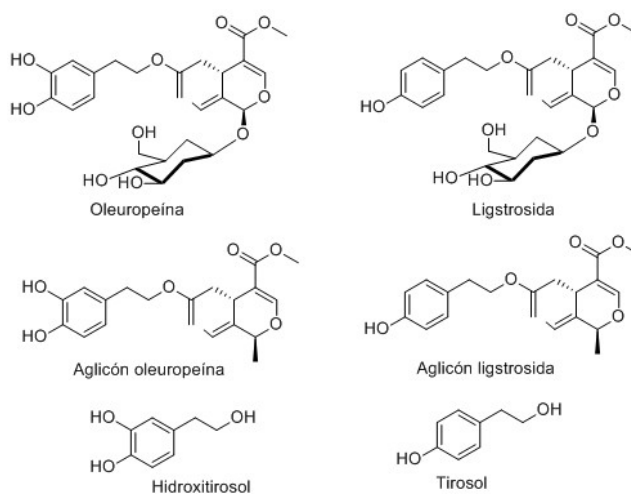


Figura 1.18. Distintas estructuras de derivados de oleuropeína y ligstrosida.

Oleuropeína no sólo está presente en el género de *Olea* también se encuentra en muchos otros géneros que pertenecen a la familia de *Oleaceae*. Se ha descrito en *Fraxinus excelsior*, *F. angustifolia*, *F. chinensis* y *F. mandshurica var japonica*. También en

(34) Vilaplana-Pérez, C.; Auñón, D.; García-Flores, L. A.; Gil-Izquierdo, A. *Frontiers in Nutrition*. **2014**.

(35) Jo, J.-O.; Jung, I.-C. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **2006**, *35* (6), 713–720.

(36) Vlachogianni, I. C.; Fragopoulou, E.; Kostakis, I. K. *Food Chem.* **2015**, *177*, 165–173.

(37) Fernandez-Bolaños, J. G.; Lopez, O.; Lopez-García, M. A.; Maset, A. *Sect. Title Biomol. Their Synth. Analog.* **2012**, 375–396.

(38) Bernini, R.; Merendino, N.; Romani, A.; Velotti, F. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 655–670.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Syringa josikaea y *S. vulgaris*, *Phillyrea latifolia*, *Ligustrum ovalifolium* y *L. vulgare*, *Jasminum polyanthum*, y *Osmanthus asiaticu*.³⁹ En 1971 Yukihiro Asaka y su equipo aislaron ligstrosida del *Ligustrum obtusifolium*, a partir de un extracto en metanol de las hojas de la planta, del cual mediante pruebas espectroscópicas concluyeron que se trataba de la 3'-dehidroxioleuropeina.⁴⁰ Como antioxidante, tirosol puede proteger las células contra el daño debido a la oxidación. Aunque no es tan potente como otros antioxidantes presentes en el aceite de oliva, su concentración más elevada en algunos alimentos y su buena biodisponibilidad indica que puede tener un papel importante en el efecto antioxidante del alimento en general.⁴¹

Tirosol y algunos derivados simples de este, han demostrado capacidad antiinflamatoria en cultivos primarios de células endoteliales aisladas de cordón umbilical humano, estos resultados son prometedores para la prevención de la aterosclerosis y otras enfermedades inflamatorias.⁴²

(39) Wichers, H. J.; Soler-rivas, C.; Espi, J. C. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80* (November 1999), 1013–1023.

(40) H, A. Y. K. T. K. T. S. *Chem. Lett.* **1972**, *1*, 141–144.

(41) Miró-Casas, E.; Covas, M.-I.; Fitó, M.; Farré-Albadalejo, M.; Marrugat, J.; de la Torre, R. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2003**, *57* (1), 186–190.

(42) Muriana, F. J. G.; Montserrat, S.; Lucas, R.; Bermudez, B.; Jaramillo, S.; Morales, J. C.; Abia, R.; Lopez, S. *Food Funct.* **2017**, *8*(8), 2905-2914.

1.3.3. Fuentes Naturales de L-DOPA

Hasta mediados del siglo XX, el aminoácido no proteico 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) fue visto únicamente como un intermedio en la síntesis biológica de la melanina y epinefrina. En los primeros años de 1960, se demostró que, L-DOPA es un precursor de neurotransmisores y que tiene aplicaciones frente al párkinson.⁴³ Gracias a algunos de estos estudios Arvid Carlsson recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en el año 2000. Además, y a modo de curiosidad, la síntesis enantioselectiva de L-DOPA, le valió a William Standish Knowles en 2001 el Premio Nobel de Química. De las más de 1000 especies de plantas de 135 familias que se han explorado para encontrar una fuente alternativa para el aislamiento de L-DOPA, se encontró que el género *Mucuna* (Leguminosae) contiene el nivel máximo de L-DOPA que se ha explotado con éxito comercialmente.^{44,45} Entre las diversas especies de *Mucuna*, *M. pruriens* es la que contiene mayores niveles de L-DOPA seguido de *M. holtonii* y *M. monosperma*. Tanto en raíces como en hojas o en semillas, la concentración de L-DOPA en *Mucuna* es bastante significativa, sin embargo en leguminosas de la especie *Vicia Faba* la concentración de L-DOPA significativa se encuentra en los cotiledones, mientras que los niveles en semillas decaen.⁴⁶

En plantas L-DOPA juega diversos roles, en los suelos actúa de manera alelopática inhibiendo el crecimiento de especies de plantas vecinas como hierbas. L-DOPA al participar en la síntesis de melanina generan varias ROS, pudiendo ser considerada una molécula prooxidante. Por otro lado, posee las propiedades propias de los antioxidantes polifenólicos, algunos estudios sugieren que el carácter pro o anti oxidante de la molécula depende de la concentración en la que se encuentre.⁴⁷

(43) Valdés, R. H.; Puzer, L.; Gomes, M.; Marques, C. E. S. J.; Aranda, D. A. G.; Bastos, M. L.; Gemal, A. L.; Antunes, O. A. C. *Catal. Commun.* **2004**, 5 (10), 631–634.

(44) Chikagwa-Malunga, S. K.; Adesogan, A. T.; Salawu, M. B.; Szabo, N. J.; Littell, R. C.; Kim, S. C.; Phatak, S. C. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2009**, 148 (1), 51–67.

(45) Inamdar, S.; Joshi, S.; Jadhav, J.; Bapat, V. *Nat. Products Bioprospect.* **2012**, 2 (1), 16–20.

(46) Goyoaga, C.; Burbano, C.; Cuadrado, C.; Varela, A.; Guillamón, E.; Pedrosa, M. M.; Muzquiz, M. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 227 (5), 1537–1542.

(47) Soares, A. R.; Marchiosi, R.; Siqueira-Soares, R. de C.; Barbosa de Lima, R.; Dantas Dos Santos, W.; Ferrarese-Filho, O. *Plant Signal. Behav.* **2014**, 9 (3), e28275.

1.4. UTILIDAD E IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS PRODUCTOS NATURALES

Hipócrates, Galeno, Plinio el Viejo y otros tantos médicos de la antigüedad ya conocían que la corteza del sauce era capaz de aliviar dolores y reducir las fiebres. Durante mucho tiempo masticar la corteza fue usado en Europa y China para el tratamiento del dolor. Este remedio también se menciona en los textos del antiguo Egipto y Sumeria. Los cheroquis y otros nativos americanos utilizaron una infusión de la corteza para la fiebre. Pero hubo que esperar hasta 1828 cuando el químico alemán Johann Buchner aisló y nombro por primera vez un glicósido del ácido salicílico, llamado en su momento salicina, a partir del nombre latino del sauce blanco (*Salix alba*).⁴⁸ Desde la prehistoria hasta nuestros días los seres humanos hemos encontrado en las plantas remedios para diversos males. Actualmente muchas culturas siguen manteniendo sus antiguas tradiciones para proporcionar remedios caseros de lo que se han llamado plantas medicinales. Así pues, no es de extrañar que una gran cantidad de medicamentos disponibles en el mercado provengan de esos denominados productos naturales.

Los productos naturales son pequeñas moléculas que se hallan ampliamente distribuidas en el reino vegetal pero que también se pueden encontrar en distintos organismos tanto terrestres como marinos.⁴⁹ Desde una visión generalista se puede hablar de producto natural como cualquier molécula presente en la naturaleza, pero en un sentido más restrictivo un producto natural es únicamente un metabolito secundario. Se puede considerar a los metabolitos secundarios como moléculas producidas para la adaptación de un organismo en concreto para sobrevivir en un ecosistema particular. Los principales esqueletos de productos naturales comprenden los ácidos grasos, antraquinonas, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, lignanos, furanos, etc. Hasta el momento los productos naturales representan aproximadamente un 30% de los fármacos descubiertos. Pero además, casi el 50% de los fármacos descubiertos recientemente son productos naturales o derivados potenciados de los mismos o sustancias que imitan a otro producto natural (lo que se suele llamar productos mímicos o análogos).² La tecnología ha permitido la evolución de las técnicas de extracción, aislamiento e identificación de una enorme cantidad de productos naturales, muchos de ellos con estructuras bastante complejas de estudiar.

(48) A. Buchner. *Repert. für die Pharm.* **1828**, 29.

(49) Chin, Y.-W.; Balunas, M. J.; Chai, H. B.; Kinghorn, A. D. *AAPS J.* **2006**, 8 (2), E239–E253.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Mirando al pasado, no fue hasta 1806 cuando Friedrich Sertürner aisló morfina de *Papaver somniferum*. A partir de ahí hasta nuestros días a medida que van apareciendo nuevos métodos de extracción, aislamiento e identificación se han podido identificar cada vez más moléculas. A día de hoy es enorme el número de moléculas estudiadas que presentan actividad biológica. Hay una gran cantidad de ejemplos de productos naturales derivados de las plantas, como taxol (paclitaxel) o artemisinina, productos con actividad antitumoral y antimalárica respectivamente. También hay numerosos ejemplos de productos naturales provenientes de microorganismos como penicilinas⁵⁰ y cefalosporinas⁵¹ que son utilizados como antibióticos. Últimamente muchos organismos marinos están siendo descubiertos como fuentes de productos naturales como ejemplo de derivado de origen marino sería (+)-discodermolida⁴⁹, aislada por primera vez en 1990 a partir de la esponja marina del Caribe *Discodermia dissoluta*, esta molécula posee actividad inmunosupresora, antifúngica y antitumoral.

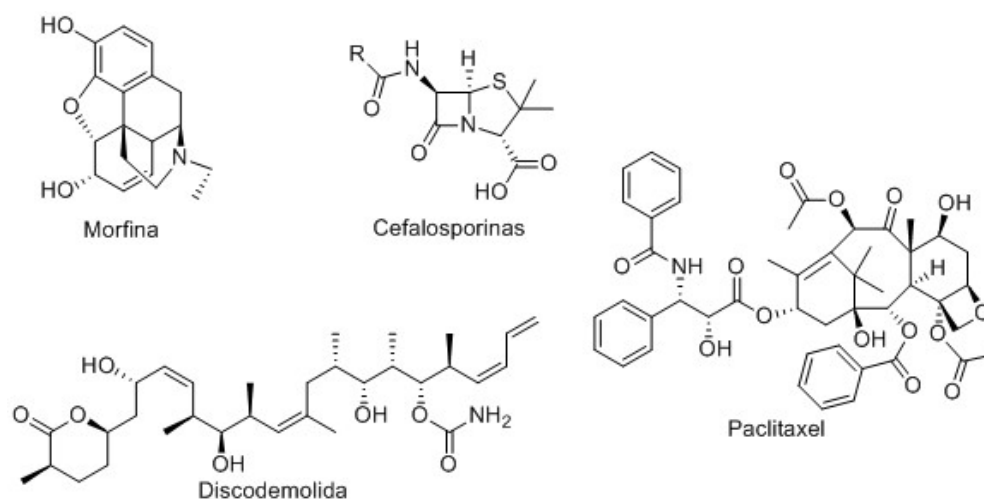


Figura 1.19. Ejemplos de algunos productos naturales citados.

La mayor desventaja de los productos naturales es que su disponibilidad suele ser baja, siendo relativamente complejo su aislamiento y su obtención en cantidad o puro. En algunos casos se puede considerar la síntesis total de estos productos, pero debido a que en su mayoría presenta estructuras complejas esta ruta sintética se hace demasiado difícil o en algunos casos imposible y muy poco rentable. Por tanto, cuando se encuentra un producto natural activo biológicamente una opción es tratar de desarrollar una síntesis partiendo de un precursor más abundante del mismo o sintetizar otro producto que imite la actuación o la estructura del producto en cuestión.

(50) Kardos, N.; Demain, A. L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 92 (4), 677–687.

(51) Zaffiri, L.; Gardner, J.; Toledo-Pereyra, L. H. *J. Investig. Surg.* **2012**, 25 (2), 67–77.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Pocos casos son tan relevantes y representativos como el de Paclitaxel o taxol⁵² este producto usado en el tratamiento de varios tipos de cánceres se puede aislar de la corteza del *Taxus brevifolia*, pero su principal desventaja reside en su baja disponibilidad, siendo uno de los productos más estudiados tanto para llevar a cabo su síntesis total como para su semisíntesis a través de precursores.⁵³

La gran ventaja del uso de productos naturales es la novedad de sus estructuras. Estructuras que la misma naturaleza y la evolución se han encargado de testar y que ofrecen configuraciones únicas y con probada actividad biológica. La química de los productos naturales ha servido para abrir nuevos campos de investigación, también ha contribuido a identificar rutas biológicas de distintas enfermedades mediante estudios *in vitro* como *in vivo*. El estudio de estos compuestos y su actividad biológica no solo permite la obtención de nuevos fármacos si no que a su vez sirven como herramienta para comprender mejor la bioquímica de los seres vivos.⁵⁴

(52) Guenard, D.; Gueritte-Voegelein, F.; Potier, P. *Acc.Chem.Res.* **1993**, *26* (34), 160–167.

(53) Nicolaou, K. C.; Yang, Z.; Liu, J. J.; Ueno, H.; Nantermet, P. G.; Guy, R. K.; Claiborne, C. F.; Renaud, J.; Couladouros, E. A.; Paulvannan, K. *Nature* **1994**, *367* (6464), 630–634.

(54) Grabley, S.; Thiericke, R. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1999**, *64*, 101–154.

1.5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

1.5.1. Métodos de Extracción de Productos Naturales

Cada vez que se descubre una nueva fuente de un producto natural con actividad biológica surge la necesidad de buscar un método óptimo para su extracción. Una definición acertada de extracción sería, la separación de sustancias biológicamente activas de los materiales inertes o inactivos de una planta u otro ser vivo, a partir del uso en la mayoría de los casos de un disolvente elegido y un proceso de extracción conveniente; donde siempre se obtienen al menos, dos componentes: la solución extraída en su disolvente (el extracto) y el residuo (el bagazo). La figura 1.20 muestra algunos de estos métodos de extracción.



Figura 1.20. Distintas metodologías de extracción de productos naturales.

La extracción mecánica se emplea principalmente en plantas y su uso no requiere la participación de disolventes y por tanto no influye la polaridad de los metabolitos a obtener, las principales técnicas son la expresión y la incisión. En la expresión, la planta o el fruto fresco se introduce en una prensa hidráulica y se exprime hasta que se obtiene su jugo. Este método extractivo se emplea para obtener zumos de cítricos, aceites, y otros.

En la incisión, los extractos se obtienen de la planta por exudación que pueden ser: gomas, resinas, mieles y otros productos que brotan en gran cantidad al realizarle incisiones o cortes a la planta viva. Pueden también clavarse tubos en la corteza, por donde fluyen las sustancias.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La destilación por arrastre de vapor, es el proceso de extracción mediante el cual se obtienen aceites esenciales. Estos aceites son productos grasos compuestos por un número muy grande de compuestos químicos aromáticos muy volátiles de estructura y composición muy compleja. La mayoría son terpenos de bajo peso molecular.



Figura 1.21. Ejemplo de montaje para el aislamiento del aceite de menta por arrastre de vapor.

La extracción con disolvente se realiza poniendo en contacto material vegetal o de cualquier otro ser vivo, generalmente triturado, con un disolvente capaz de solubilizar los metabolitos de interés. Los productos naturales deben pasar de la fuente al disolvente de manera que se obtenga un extracto líquido (con los principios activos disueltos) y la matriz sobrante (bagazo). En función de la naturaleza polar de los metabolitos a extraer se debe elegir un disolvente capaz de solubilizarlos, siendo los principales disolventes: agua, mezclas hidroalcohólicas, propilenglicol, disolventes orgánicos y fluidos supercríticos.

Los principales factores que influyen en la extracción con disolventes son:

Temperatura: El calor favorece y acelera la extracción, pero también puede generar la descomposición térmica de los metabolitos de interés.

Tiempo de extracción: va ligado a múltiples factores como las características propias de la matriz (dureza, grado de división) y de la naturaleza de los productos naturales (volátiles, hidrolizables, oxidables, entre otros).

En la extracción discontinua la matriz se sumerge completamente en el disolvente, por lo que toda su superficie está en contacto con el disolvente, difundándose los principios activos de la matriz al disolvente hasta alcanzar el equilibrio.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En la maceración, la matriz seca y molida se pone en contacto con el disolvente a temperatura ambiente, dejando la mezcla en reposo durante un tiempo determinado (normalmente de 3 a 10 días). Transcurrido el tiempo de maceración, se decanta el extracto y se elimina el residuo vegetal. Se recomienda hacer una segunda extracción. Una variante de este método es la digestión, la que se realiza con calentamiento.

En la infusión, el disolvente se hierve y posteriormente se introduce la matriz a extraer, dejándose enfriar el conjunto hasta temperatura ambiente. El extracto recibe el nombre de infusión o té.

En la decocción, la matriz se cubre con el disolvente y el conjunto se lleva a ebullición, manteniéndose durante entre 15 y 30 minutos. Posteriormente se enfría y se filtra. El extracto es llamado “decoto”. Tanto en la infusión como en la decocción, se suele emplear agua como disolvente

La extracción continua se realiza haciendo pasar por la matriz un flujo constante de disolvente, arrastrando a los principios activos de un paso. Este proceso permite extraer casi por completo, los compuestos químicos presentes en la matriz.

La percolación consiste en colocar la matriz en una columna que está en contacto permanente con el disolvente que gotea por la parte inferior. Constantemente se adiciona disolvente puro por la parte superior de la columna, de tal manera que se compensa la cantidad de disolvente que sale por la parte inferior.

La extracción en Soxhlet, consiste en hacer hervir en el matraz el disolvente con el cual se va a extraer la materia sólida deseada que se encuentra en la muestra depositado en el cartucho del “Soxhlet”.

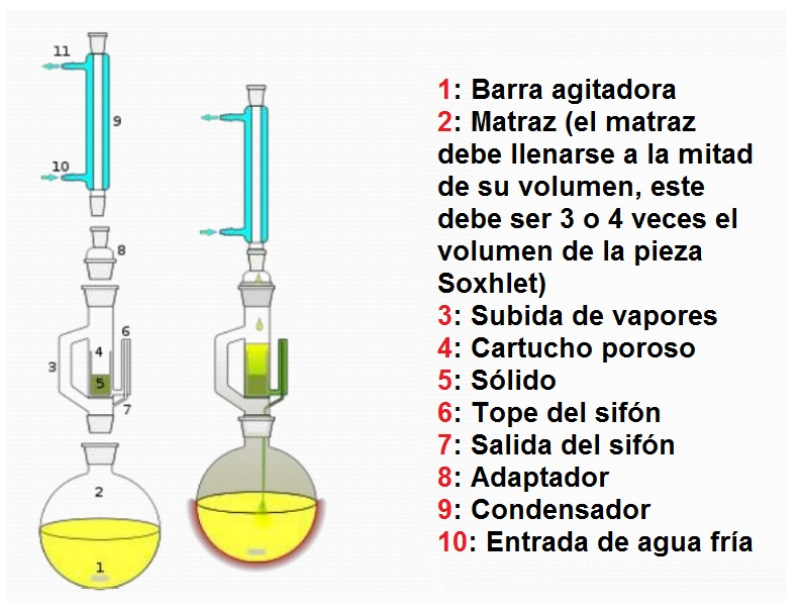


Figura 1.22. Esquema de un montaje típico de Soxhlet

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los vapores del disolvente ascienden por el extractor y se condensan en el refrigerante cayendo gota a gota sobre el cartucho. La parte soluble pasa por gravedad al matraz. El nombre de este aparato hace referencia a su inventor el químico alemán Franz Ritter von Soxhlet originario de Brno. Soxhlet diseñó este aparato con el fin de extraer material lipídico de matrices sólidas.

Todas estas extracciones que requieren calentamiento del disolvente puede realizarse mediante aparatos especiales que utilizan las microondas como fuente calor, mejorando sensiblemente el tiempo y la cantidad de metabolito extraído en comparación con los métodos tradicionales de suministrar calor, como la placa calentadora o el baño de aceite.^{55,56}

La extracción asistida por microondas (MAE) de productos naturales se inició a finales de los años ochenta y, a través de los avances tecnológicos, se ha convertido en uno de los métodos de extracción más populares y rentables de los que hay disponibles en la actualidad. Existen varias instrumentaciones y metodologías MAE avanzadas, como por ejemplo el método de extracción asistida por microondas presurizada (PMAE) o también el método de extracción asistida por microondas sin disolvente (SFMAE).⁵⁷

La radiación electromagnética de microondas que incide sobre una mezcla de disolvente y material biológico produce tres efectos fundamentales para la extracción:

- Aumento de la temperatura del disolvente y su consiguiente capacidad para disolver solutos.
- Migración electroforética de los solutos por el campo eléctrico producido por la radiación.
- Vaporización de agua en interior de las células produciendo una rotura de la pared celular o membranas plasmáticas.

(55) Harborne, J. B. (Jeffrey B. . *Phytochemical methods : a guide to modern techniques of plant analysis*; Chapman and Hall, **1998**.

(56) Abramovitch, R. A. *Org. Prep. Proced. Int.* **1991**, 23 (6), 683–711.

(57) Delazar, A.; Nahar, L.; Hamedeyazdan, S.; Sarker, S. D. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; **2012**; Vol. 864, pp 89–115.

1.5.2. Métodos para la Separación y Purificación de Productos Naturales

Una vez vistas las distintas técnicas de extracción de productos naturales de su fuente, el siguiente paso a la hora de obtener un metabolito puro es a través de métodos de separación y purificación. Existen multitud de métodos para separar y purificar productos naturales. En su mayoría estos métodos se basan en reacciones de equilibrio o equilibrios de fase y puesto que las constantes de equilibrio normalmente tienen valor distinto de infinito o cero la separación total de los productos no suele darse.

Las principales de técnicas de separación son:

- **Filtración**, este proceso mecánico permite separar sólidos de líquidos o gases, pasando la mezcla a través de una hoja porosa tal como una tela o membrana que retiene los sólidos y permite que el líquido o gas pase a través.

- **Centrifugación**, es un método por el cual se pueden separar sólidos de líquidos de diferente densidad por medio de una fuerza giratoria. La fuerza centrífuga es provista por una máquina llamada centrifugadora, la cual imprime a la mezcla un movimiento de rotación que origina una fuerza que produce la sedimentación de los sólidos y líquidos con las partículas de mayor densidad.

- **Evaporación**, este método se utiliza para eliminar los líquidos volátiles de los solutos no volátiles que no pueden ser separados por medio de la filtración debido al pequeño tamaño de las sustancias. En ciertos casos una variante de la evaporación puede ser la liofilización, que elimina los disolventes mediante sublimación.

- **Extracción líquido-líquido**, se usa para separar una mezcla aprovechando la diferencia de solubilidad de sus componentes entre dos disolventes inmiscibles o parcialmente miscibles, pudiéndose eliminar una impureza o recuperar un producto deseado.

- **Cristalización**, separa un producto de una mezcla en disolución, a menudo en forma extremadamente pura. Esto se consigue mediante el enfriamiento de la mezcla, evaporación lenta del disolvente o adicionando agentes precipitantes que disminuyen la solubilidad del producto deseado de modo que forme cristales. Los cristales sólidos puros se separan luego del licor restante por filtración o centrifugación.

- **Adsorción**, permite eliminar una impureza soluble de una mezcla atrapándola sobre la superficie de un material sólido como carbón activado que forma fuertes enlaces químicos no covalentes con la impureza. La cromatografía emplea adsorción y desorción en un lecho relleno de un sólido para purificar múltiples componentes de una sola mezcla.

1.5.3. Principales Técnicas para la Cuantificación de Productos Naturales

Conocer la concentración de un metabolito en una muestra biológica es sumamente importante, sobre todo cuando se descubre un metabolito con actividad terapéutica en un alimento. Es por ello por lo que la química orgánica de productos naturales se vuelve un campo interdisciplinar combinándose con la química analítica.⁵⁸ Espectroscopia de NMR (resonancia magnética nuclear), MS (espectrometría de masas) y la cristalografía de rayos X son las herramientas analíticas más utilizadas para la determinación estructural de un metabolito puro, aunque se han aplicado otras técnicas analíticas como la espectroscopia de infrarrojo.

Para el caso de la cuantificación existen tantas metodologías como familias de compuestos, desde los métodos clásicos como el análisis gravímetro o volumétrico⁵⁹, pasando por técnicas instrumentales espectroscópicas, electroanalíticas o electroforéticas, hasta las cuantificaciones por bioensayos.⁶⁰ Aunque mayormente los métodos acoplados a HPLC han sido los predominantes a la hora de cuantificar productos, el uso de espectroscopia de ¹H NMR para la cuantificación y determinación de la pureza está tomando cada vez más presencia. Las ventajas principales de esta técnica son que pueden utilizarse para muestras muy pequeñas, no son destructivas para la muestra, son rápidas y proporcionan alta precisión.⁶¹

La cuantificación mediante NMR normalmente se realiza mediante calibración, como señal se usa la relación entre la integración de alguna señal específica del metabolito junto con alguna señal de un patrón añadido como referencia, y mediante el uso de una regresión de mínimos cuadrados se puede conocer la concentración de ese metabolito en una muestra.⁶²

(58) Zhang, A.; Sun, H.; Wang, P.; Han, Y.; Wang, X. *Analyst* **2012**, *137* (2), 293–300.

(59) Adejor, E. B.; Owolabi, O. A.; James, D. B.; Nwaozuzu, N. Q.; Oloba, T.; Luca, C. D. *Res. J. Appl. Sci. Eng. Technol.* **2013**, *6* (10), 1846–1850.

(60) Weinstein, Z. B.; Zaman, M. H. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42644.

(61) Cushman, M.; Georg, G. I.; Holzgrabe, U.; Wang, S. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (22), 9219.

(62) Lars I. Nord, †,‡; Pia Vaag, §. and; Jens Ø. Duus*, †. **2004**. *76* (16), pp 4790–4798.

1.5.4. Aislamiento y Caracterización de los Ácidos Maslínico y Oleanólico

Ácido oleanólico y ácido maslínico son dos ácidos triterpénicos que son aislados en cantidad aprovechado como recurso los desechos de molturación de la aceituna. Para ello el Grupo de investigación “Biotransformación y Química de Productos Naturales” desarrolló las patentes, nacional (P96061652) e internacional (W098/04331) titularizadas por la Universidad de Granada. En la figura 1.23 se resume el procedimiento de aislamiento utilizado en las patentes para de estos ácidos. Para la extracción de estos terpenos se realiza una primera extracción en soxhlet con hexano, disolviéndose principalmente ácido oleanólico por ser más apolar, aunque como se verá más adelante este proceso pude ser mejorado. El residuo solido es extraído una segunda vez en Soxhlet con acetato de etilo extrayendo esta vez ácido maslínico con restos de oleanólico. Ambos ácidos triterpénicos poseen esqueleto de olean-12-eno con un grupo carboxilo β en C-17.

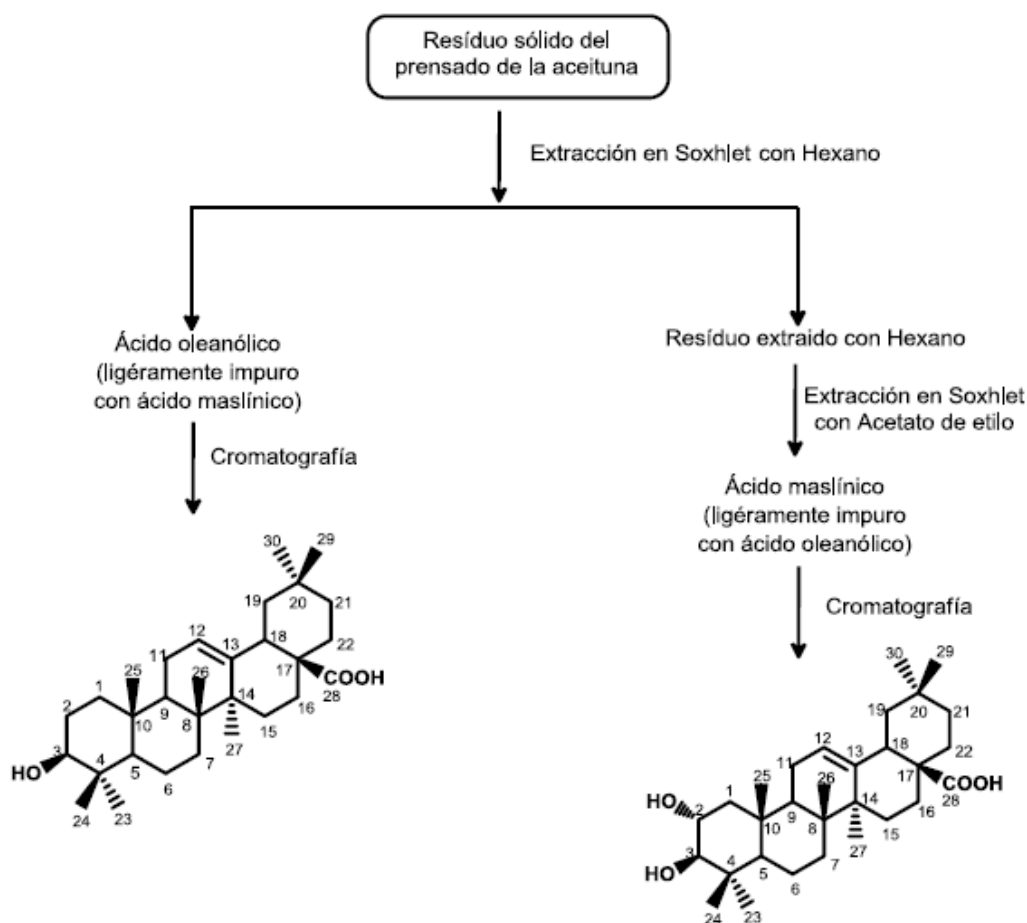


Figura 1.23. Obtención de ácido oleanólico y ácido maslínico.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Ácido oleanólico tiene una fórmula molecular medida por espectroscopia de masas de $C_{30}H_{48}O_3$ por tanto, su peso molecular de 456 u.m.a. En su espectro de 1H RMN se observa a δ_H 5.25 ppm un doble doblete ($J_1= J_2= 3.6$ Hz) que, por desplazamiento y tipo de señal, debe corresponder al protón etilénico de C-12 acoplado con los dos hidrógenos de C-11. A δ_H 3.16 ppm se encuentra un doble doblete ($J_1= 11.2$ Hz y $J_2= 4.8$ Hz), que es atribuido al protón axial geminal al alcohol 3β ecuatorial y a 2.84 ppm se sitúa el protón alílico de C-18 como doble doblete por su acoplamiento con los dos protones de C-19 ($J_1= 13.6$ Hz y $J_2= 3.7$ Hz). Por último, las señales de siete metilos singletes se localizan a δ_H 1.15 (3H-27), 0.97 (3H-23), 0.93 (3H-25 y 3H-30), 0.90 (3H-29), 0.80 (3H-26) y 0.77 (3H-24). La estructura de ácido 3β -hidroxiolean-12-en-28-oico para el ácido oleanólico puede ser completamente confirmada mediante el estudio de los espectros de ^{13}C RMN, COSY, HMBC y HMQC y por comparación de estos datos con los publicados.⁶³

A consecuencia de la presencia de otro hidroxilo en C-2 ácido maslínico posee mayor polaridad que ácido oleanólico, pero características físicas y espectroscópicas similares. Este metabolito presenta un espectro de masas que indica una fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_4$ siendo, por tanto, su peso molecular de 472 u.m.a.

El espectro de 1H RMN de ácido maslínico muestra similitudes con el de ácido oleanólico, pero aparece una nueva señal a δ_H 3.62 (1H, ddd, $J_1= 11.3$ Hz, $J_2= 9.6$ Hz, $J_3= 4.5$ Hz) atribuible a un protón axial geminal al grupo hidroxilo en C-2, que se acopla con el protón axial sobre C-3 (δ_H 2.91, 1H, d, $J= 9.6$ Hz). En cuanto al espectro de ^{13}C RMN, se comprueba con respecto al ácido oleanólico la desaparición de un carbono metilénico (C-2) y la aparición de un nuevo carbono metínico oxigenado a δ_C 69.5 ppm. La estructura de ácido $2\alpha,3\beta$ -dihidroxiolean-12-en-28-oico para el ácido maslínico puede ser completamente confirmada mediante el estudio de los espectros de ^{13}C RMN, COSY, HMBC y HMQC y por comparación de estos datos con los publicados.⁶⁴

(63) Khlif, I.; Hamden, K.; Damak, M.; Allouche, N. *Chem. Nat. Compd.* **2012**, *48* (5), 799–802.

(64) Yamagishi, T.; Zhang, D. C.; Chang, J. J.; McPhail, D. R.; McPhail, A. T.; Lee, K. H. *Phytochemistry* **1988**, *27* (10), 3213–3216.

1.5.5. Aislamiento y Caracterización de Tirosol e Hidroxitirosol

Tirosol e hidroxitirosol son fenoles, que se aíslan de los desechos secos de molturación de la aceituna, según el procedimiento que será expuesto a continuación esquemáticamente y que ha sido desarrollado por el Grupo de investigación “Biotransformación y Química de Productos Naturales”, encontrándose perfectamente detallado en la patente internacional (WO2007/093659) titularizada por la Universidad de Granada. Estos desechos secos, obtenidos por diferentes tratamientos, son finalmente triturados y extraídos con un aparato Soxhlet con hexano y cuando se considera agotada la extracción con este disolvente (por análisis del residuo), se hace una nueva extracción de los diferentes cartuchos con acetato de etilo hasta nuevo agotamiento de los mismos, con estas dos extracciones las fracciones terpénicas quedan extraídas.

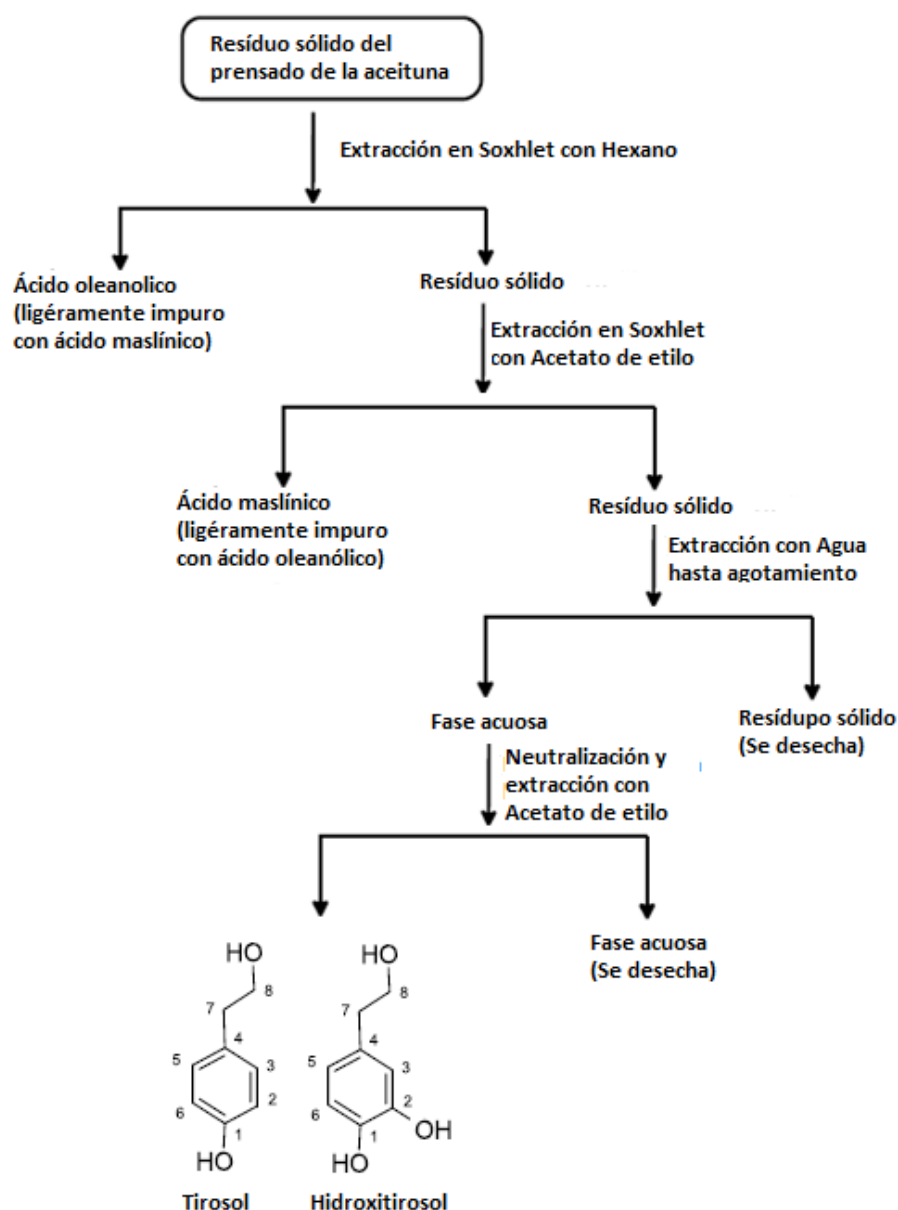


Figura 1.24. Obtención de la mezcla de Tirosol e Hidroxitirosol.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los residuos sólidos son tratados después con agua hasta agotamiento del sólido, la fracción acuosa se neutraliza con bicarbonato sódico y se extrae de nuevo con acetato de etilo, esta nueva fracción orgánica se concentra y se desecha la fracción acuosa, en el sirupo obtenido de la fase orgánica se encuentran tirosol e hidroxitirosol.

Tirosol tiene una fórmula molecular medida por espectrometría de masas de $C_8H_{10}O_2$ por tanto, su peso molecular de 138 u.m.a. En su espectro de 1H RMN se observan dos señales ya que tiene cuatro protones equivalentes dos a dos a δ_H 6.76 ppm (d, 2H, $J_{2,3 \text{ o } 5,6} = 9.0$ Hz, H-3 y H-5) y a δ_H 7.08 ppm (d, 2H, $J_{2,3 \text{ o } 5,6} = 9.0$ Hz, H-2 y H-6), δ_H para C-7 y C-8 son 2.66 ppm (t, 2H, $J_{7,8} = 6.6$ Hz, H-7), 3.70 ppm (t, 2H, $J_{7,8} = 6.6$ Hz, H-8), respectivamente, C-8 se encuentra más desplazado puesto que se encuentra hidroxilado. El espectro de ^{13}C RMN muestra un δ_C para el carbono que soporta el hidroxilo fenólico a 156.7 ppm (C-1), el resto de carbonos aromáticos muestran los siguientes δ_C 131.0 (C-4), 130.8 (C-3 y C-5), 116.1 (C-2 y C-6). Las señales de la cadena lateral se encuentran en δ_C 38.4 ppm (C-7), 63.6 ppm (C-8), estando la señal de C-8 más desplazada por la misma razón que lo está en el 1H RMN. La estructura de 4-(2-hidroxietil)fenol para tirosol puede ser completamente confirmada mediante el estudio de los espectros de ^{13}C RMN, COSY, HMBC y HMQC y por comparación de estos datos con los publicados.^{65,66}

La presencia de otro hidroxilo fenólico en C-2 en hidroxitirosol le confiere mayor polaridad que tirosol, pero características físicas y espectroscópicas similares. Este polifenol tiene de fórmula molecular $C_8H_{10}O_3$ y su peso es de 154 u.m.a. en 1H RMN hidroxitirosol y tirosol se diferencian solamente en las señales de los protones aromáticos, a diferencia de tirosol que presentaba dos señales aromáticas de sus cuatro protones equivalentes dos a dos, hidroxitirosol muestra tres señales en la zona de los protones aromáticos, cada señal perteneciente a un protón siendo 6.53 (dd, 1H, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-5), 6.65 ppm (d, 1H, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, H-3), 6.71 ppm (d, 1H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-6).

En cuanto al espectro de ^{13}C RMN la diferencia está en los carbonos que soportan los hidroxilos fenólicos. Así, para tirosol, que sólo muestra una señal en esta zona, mientras que hidroxitirosol presenta dos señales en su espectro a δ_C 143.0 ppm (C-1), 144.4 ppm (C-2) siendo el resto de señales similares entre ambos compuestos. La estructura de 4-(2-hidroxietil)-1,2-benzenodiol para hidroxitirosol puede ser completamente confirmada mediante el estudio de los espectros de ^{13}C RMN, COSY, HMBC y HMQC y por comparación de estos datos con los publicados.⁶⁷

(65) Chen, H.; Fujita, M.; Feng, Q.; Clardy, J.; Fink, G. R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. April **2004**, pp 5048–5052.

(66) Adhami, H. R.; Zehl, M.; Dangel, C.; Dorfmeister, D.; Stadler, M.; Urban, E.; Hewitson, P.; Ignatova, S.; Krenn, L. *Food Chem.* **2015**, *170*, 154–159.

(67) Charisiadis, P.; Kontogianni, V. G.; Tsioufoulis, C. G.; Tzakos, A. G.; Siskos, M.; Gerathanassis, I. P. *Molecules* **2014**, *19* (9), 13643–13682.

1.5.6. Aislamiento y Caracterización de L-DOPA.

Levodopa es un aminoácido no proteico que se aísla en cantidad aprovechado como recurso material vegetal procedente de la molturación diversas partes de leguminosas de la familia de las *Fabaceae*. Para la extracción de este metabolito se realizan varias extracciones a reflujo con agua clorhídrica 0.1 N disolviéndose principalmente levodopa que es extremadamente polar, una vez extraída se centrifuga para desechar la fase sólida y la disolución acuosa se concentra mediante liofilización.

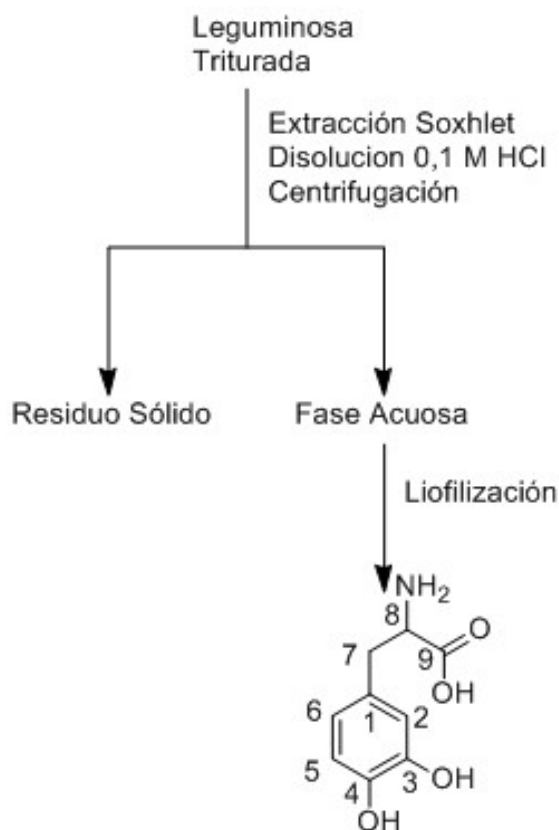


Figura1.25. Estructura de L-Dopa.

Levodopa tiene una fórmula molecular medida por espectrometría de masas de C₉H₁₁NO₄ dando por tanto un peso molecular de 197.19 u.m.a. En su espectro de ¹H RMN se observan tres señales en la zona de los protones aromáticos, cada señal perteneciente a un protón siendo 6.76 (d, 1H, J_{5,6}=8.0 Hz, H-5), 6.69 ppm (d, 1H, J_{2,6}=2.1 Hz, H-2), 6.60 ppm (dd, 1H, J_{2,6}=2.1 Hz, J_{5,6}=8.1 Hz, H-6), δ_H para C-8 al estar unido a un carbono con una amina aparece a 3.78 ppm (dd, 1H, J_{7,8}=7.7 Hz, J_{7,8}=5.1 Hz, H-8), mientras que en los protones de (C-7) tienen unos δ_H a 3.01 ppm (dd, 1H, J_{7,7}=14.6 Hz, J_{7,8}=5.1 Hz, H-7b) y a 2.75 ppm (dd, 1H, J_{7,7}=14.6 Hz, J_{7,8}=7.8 Hz, H-7a) respectivamente debido a la quiralidad de (C-8).

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El espectro de ^{13}C RMN muestra un δ_{C} a 174 para el carboxilo (C-9), los carbonos de los hidroxilos fenólicos tienen sus señales a 144.2 ppm (C-3) y 143.3 ppm (C-4), el resto de carbonos aromático muestran los siguientes δ_{C} 127.5 (C-1), 121.7 (C-6), 116.8 (C-2) y 116.4 (C-5). Las señales de la cadena lateral se encuentran en δ_{C} 35.5 ppm (C-7), 55.9 ppm (C-8), estando la señal de C-8 más desplazada por la misma razón que lo está en el ^1H RMN. La estructura de ácido (S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil) propanoico para levodopa puede ser completamente confirmada mediante el estudio de los espectros de ^{13}C RMN, COSY, HMBC y HMQC y por comparación de estos datos con los publicados.^{68,69}

(68) Yoon, S. H.; Bruce Fulton, D.; Robyt, J. F. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344* (17), 2349–2356.

(69) Sayyed, I. A.; Sudalai, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15* (19), 3111–3116.

1.6. EL OLIVO (*OLEA EUROPAEA*)

El olivo junto con los cereales y la vid forman los tres pilares principales de la cultura agrícola tradicional, asentada en la cuenca mediterránea y oriente próximo desde la edad de bronce. Aunque resulta complicado precisar el lugar exacto donde comenzó su cultivo, existen referencias documentales fiables que señalan el uso del aceite de oliva en el Antiguo Egipto. En nuestros días el cultivo del olivo se extiende por toda la cuenca del Mediterráneo y también en otras zonas con clima similar como son California, algunos países de América del Sur y Australia.

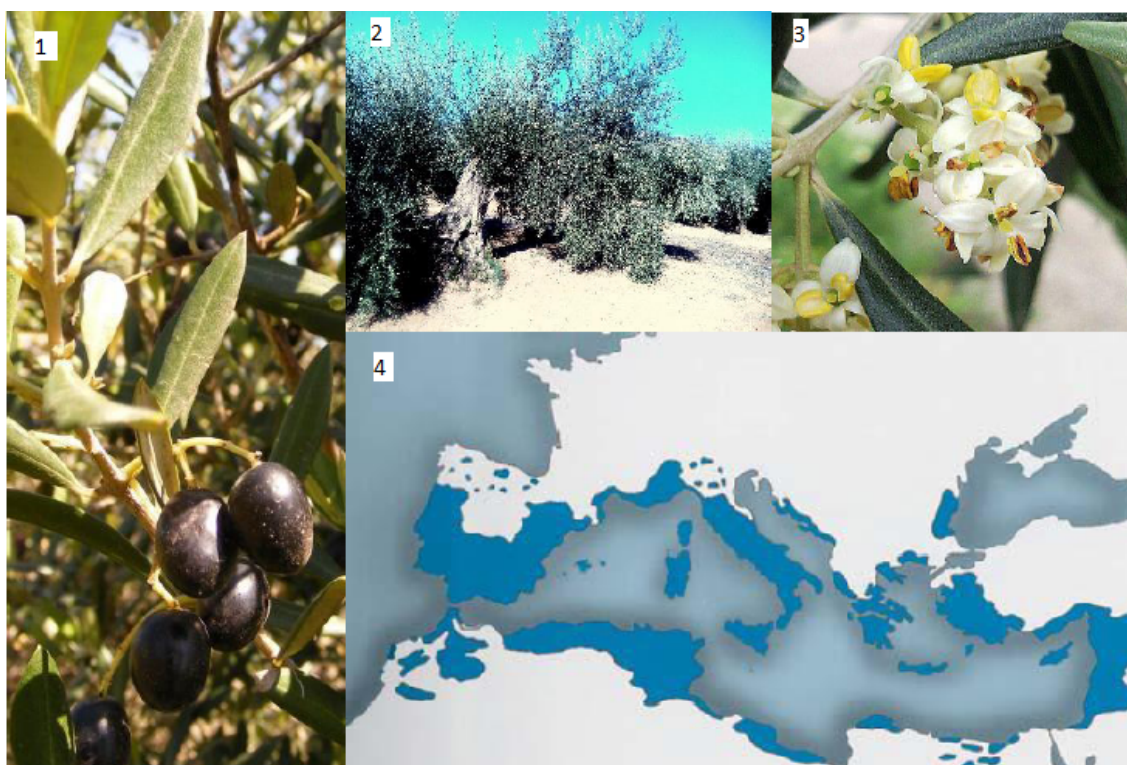


Figura 1.26. Fruto, árbol y flores de *Olea europaea* (1, 2 y 3). Regiones donde es cultivado el olivo en la cuenca mediterránea(4).⁷⁰

Sobre el origen etimológico del nombre olivo existen varias corrientes, una de las principales intuye que el origen de la palabra “oliva” proveniente del dialecto cretense elaiwa, y este término del griego clásico: elaia (ελαία), usándose elaialah para el aceite de oliva. Las raíces tanto de elaiwa y elaia se encuentran en el término semítico (que hace referencia a los pueblos que se establecieron en Mesopotamia y el Próximo Oriente con anterioridad al primer milenio antes de Cristo): “ulu” que termino derivando finalmente en la palabra latina: oleum y que posteriormente evoluciono en la palabra “oli” de las lenguas romances.⁷¹

(70) Ghedira, K. *Phytothérapie* **2008**, 6 (2), 83–89.

(71) Hosking, R. *Food and language : proceedings of the Oxford Symposium on Food and Cookery* **2009**; Prospect Books, 2010.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Desde el punto de vista botánico el olivo es un árbol perennifilo, longevo, su altura puede llegar hasta los 15 metros, de copa ancha, tronco a menudo corto y retorcido, con corteza gris plata finamente fisurada especialmente con el tiempo pues el árbol joven posee corteza lisa. Las hojas, oblongas tienen el ápice ligeramente puntiagudo, de color verde plateado, cerosas por el haz y densamente escamosas por el envés. En cuanto a sus flores son bisexuales, con corola blanca y plumosa. El fruto conocido como aceituna, es una drupa muy oleosa de 1 a 3,5 cm de largo, ovoide, verde al principio, y que precisa de un año para adquirir un color negro-morado en su plena madurez. El periodo de floración en el hemisferio norte va desde mayo a julio y su periodo de fructificación comprende entre los meses de septiembre y diciembre. Los componentes químicos mayoritarios de la fruta y la hoja del olivo se resumen en la siguiente tabla.⁷⁰

Parte utilizada	Fracción o Familia química	Constituyentes químicos
Fruto La aceituna es rica en agua (40-45 %), en glucidos (10-20 %) y en lípidos que representa el 30 % del peso del fruto maduro.	Fracción saponificable	Ácido palmítico 7,5-20 %, Ácido palmítico 0,3-3,5 Ácido esteárico 0,5-5,0 % Ácido oléico 55-83 % Ácido linoleico 3,5-21,0 % Ácido α -linolénico > 0,9 %
	Fracción insaponificable	Escualeno 300-700 mg Esteroles como β -sitosterol 70-90 mg Alcoholes triterpénicos 100-300 mg α -tocoferol 4-13 mg β -tocoferol 1-2 mg Compuestos fenólicos 50 mg Hidroxitirosol 0,01-1 mg y tirosol
Hojas	Triterpenos	Ácido Oleanólico y Maslínico
	Flavonoides	-Luteolina, camferol, miricetina, quercetina, apigenina -Rutósido, y los glucósidos de apigenina, quercitrina y luteolina
	Secoirridoides	Oleopeina, 11-dimetil-oleopeina, oleósido, Oleósido dimetilester, ligustrosido, oleurosido y oleceina
	Ácidos fenólicos	Ácido cafeico, ácido cafeoquinico, ácido p-cumárico, verbacosido.

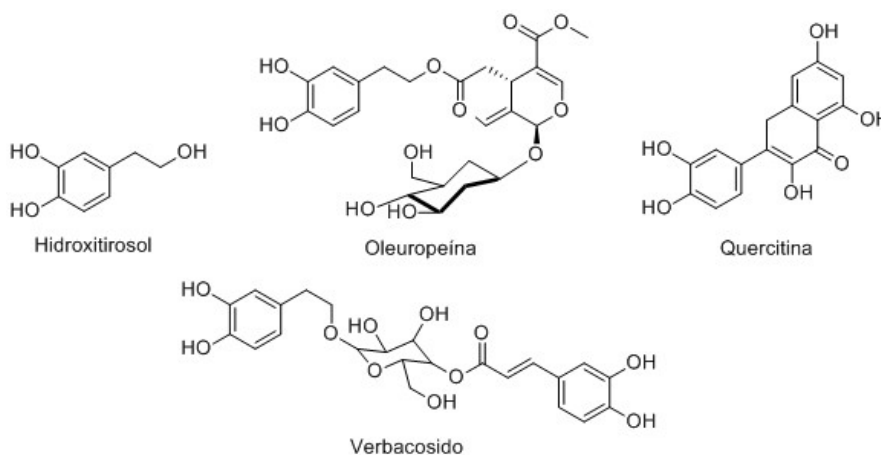


Figura 1.27. Composición y estructuras de los principales metabolitos secundarios de la aceituna.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La constitución tan característica de metabolitos beneficiosos es lo que confiere al aceite de oliva su alto valor añadido, por tanto su consumo favorece la salud, reduciendo el nivel de colesterol, el riesgo de infarto es menor, disminuyen las probabilidades de trombosis arteriales, ofrece protección gástrica contra úlceras y gastritis puesto que rebaja la acidez, estimula la secreción de la bilis, es beneficioso para nuestro crecimiento óseo y concede una extraordinaria mineralización del hueso, es el aceite vegetal más conveniente para prevenir los efectos deterioradores propios de la edad sobre las funciones cerebrales y en general el envejecimiento de los tejidos y de los órganos.⁷²

Así, cabe resaltar que hidroxitirosol, se considera uno de los antioxidantes de origen natural más potentes. Su coeficiente ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), es de 400 μM , similar a los valores de α -tocoferol o de butilhidroxitolueno BHT. También se ha estudiado que este metabolito favorece el descenso del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, ayuda a prevenir la aparición de ciertos tipos de cáncer (especialmente de colon y piel), poseyendo así propiedades antiinflamatorias y antivíricas.^{34,73} Por otro lado, la oleuropeína ayuda a la formación de óxido nítrico, interviniendo como vasodilatador potente, además de proteger los vasos sanguíneos y actuar como antibacteriano.

Asimismo, se ha detallado que los ácidos maslínico y oleanólico se encuentran presentes sobre todo en la cera epicular de las aceitunas, pudiendo ser detectados en aceite de oliva virgen extra, concentraciones menores de 100 ppm, aunque en aceites de orujo las cantidades pueden superar las 300 ppm, debido al enriquecimiento de la fase oleosa durante el almacenamiento de la pasta expuesta al aire durante meses. Por tanto, ambos ácidos quedan mayoritariamente en el residuo sólido, llamado orujo u orujillo (cuando el aceite se extrae por centrifugado en 3 fases), estos restos están constituidos por restos de piel (15-30%), hueso (30-45%) y sólidos finos de pulpa (30-50%).

En 2010 se estimó que en el conjunto de las agroindustrias del sector del olivar en Andalucía, produjeron por año: 277.063 toneladas de hueso de aceituna, 432.984 toneladas de hojín y 985.552 toneladas de orujillo.⁷⁴ El orujo suele ser reciclado dándole un segundo centrifugado para obtener parte del aceite residual que contiene, después se seca para extraer con disolventes orgánicos el llamado aceite de orujo y por último suele servir como combustible en procesos térmicos o para la generación de electricidad, debido a su bajo porcentaje de humedad, y su elevado poder calorífico en torno a 4.100 kcal/kg en base seca.

(72) Visioli, F.; Bernardini, E. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17* (8), 786–804.

(73) Owen, R. .; Giacosa, A.; Hull, W. .; Haubner, R.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. *Eur. J. Cancer* **2000**, *36* (10), 1235–1247.

(74) Callejo López, J. A.; Parra Heras, T.; Manrique Gordillo, T. **2010**, 70.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El uso de alpeorujo es extremadamente rentable, ya que el uso de energías alternativas recibe subsidio económico y aparte las almazaras suelen entregarlo a pie de planta libre de costes. No obstante, como consecuencia de la combustión de alpeorujo se han detectado hidrocarburos policíclicos aromáticos en el aceite de orujo (benzopireno),⁷⁵ además a esto hay que sumarle el impacto de otros gases que se generan, estos dos motivos están impulsando la creación de nuevas técnicas verdes para aprovechar el alpeorujo, como por ejemplo de compostaje.

Así pues, la presencia de estos dos ácidos con propiedades farmacológicas tan apreciables hace que se desarrollen nuevos procesos para su aislamiento y aplicabilidad, generando una nueva vía para el aprovechamiento del residuo.

(75) Stenerson, K. K.; Shimelis, O.; Halpenny, M. R.; Espenschied, K.; Ye, M. M. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (20), 4933–4939.

1.7. LA MUCUNA (*MUCUNA PRURIENS*)

La agricultura de los cereales y legumbres tiene su origen en el neolítico, siendo el guisante, el garbanzo y la lenteja las tres primeras especies de legumbres en ser domesticadas en la zona de oriente próximo.⁷⁶ Por definición se denomina legumbre a la semilla de las plantas pertenecientes a la familia de las leguminosas o *Fabaceae*. Las leguminosas tiene una distribución muy amplia con alrededor de 730 géneros y 19400 especies, haciendo de esta la tercera familia con mayor riqueza de especies después de las compuestas las asteráceas (*Asteraceae*) y las orquídeas (*Orchidaceae*).⁷⁷ Una de las tribus principales de esta familia es la de *Phaseoleae* la cual contiene géneros tales como *Erythrinae* (*Mucuna*), *Glycine* (soja), *Phaseolus* (frijoles americanos) y *Vigna* (judías asiáticas), que son económicamente muy importantes por su papel en la nutrición humana y en su uso como forraje de ganado.⁷⁸

La *Mucuna* es una planta anual que tiene ramas trepadoras largas y esbeltas pudiendo llegar a más de 15 m; sus hojas son alternas, lanceoladas; de flores blancas con una corola azulado-púrpura, en forma de mariposa. Las vainas son peludas y gruesas; teniendo un promedio de 4 pulgadas de largo; tienen forma como los agujeros por los que sale el sonido de un violín y contienen de cuatro a seis semillas.⁷⁹

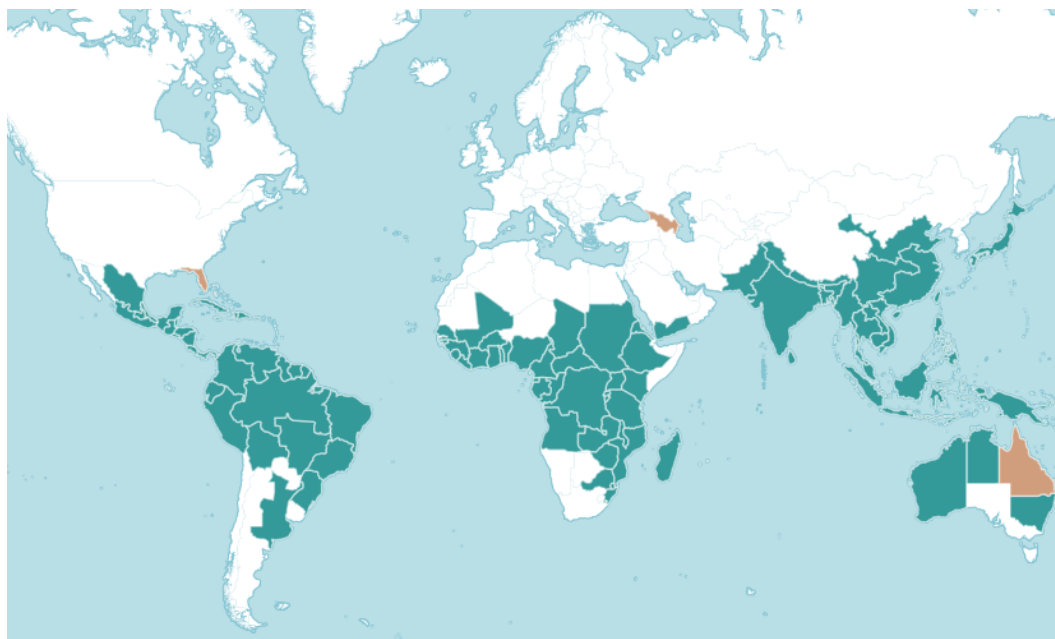


Figura 1.28. Regiones donde la *Mucuna* es nativa (azul), introducida (marrón).

(76) Varshney, R. K.; Close, T. J.; Singh, N. K.; Hoisington, D. A.; Cook, D. R. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2009**, 12 (2), 202–210.

(77) Judd, W. S. *Plant systematics : a phylogenetic approach.* **2008** pp: 611

(78) Mercado-Ruaro, P.; Delgado-Salinas, A. *Genet. Mol. Biol.* **2000**, 23 (4), 985–987.

(79) Lampariello, L. R.; Cortelazzo, A.; Guerranti, R.; Sticozzi, C.; Valacchi, G. J. *Tradit. Complement. Med.* **2012**, 2 (4), 331–339.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Este género puede ser encontrado de manera nativa en Asia-Tropical, África, Pacífico, América del Sur, Australasia, América del Norte y Asia-Templada.^{80,81} En la región pantropical mostrada en la figura anterior se han reconocido unas 100 especies de *Mucuna*, entre las cuales hay mucha diversidad morfológica.⁸²

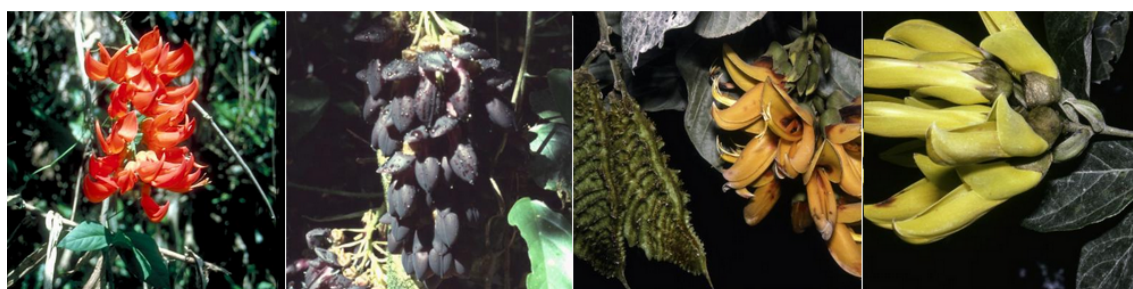


Figura.1.29. Diversas plantas de *Mucuna*.

Como se puede ver en la tabla siguiente las distintas especies de *Mucuna* tienen alto valor nutricional por su alto contenido en proteínas.

Especies	Proteína Cruda (%)	Grasa Cruda (%)	Fibra Cruda (%)	Cenizas (%)	Carbohidratos (%)
<i>Mucuna cochinchinensis</i>	38,4	9,6	6,8	3,3	44,8
<i>Mucuna deeringiana</i>	38,2	8,7	5,7	3,4	45,2
<i>Mucuna monosperma</i>	23,5	14,3	6,7	3,2	52,2
<i>Mucuna pruriens</i>	32,4	5,7	7,8	3,6	50,6
<i>Mucuna utilis</i>	26,4	4,1	6,3	3,7	59,5
<i>Mucuna veracruz</i> (black)	24,5	6,9	4,2	3,6	64,8

Figura 1.30. Composición proximal de algunas especies del género *Mucuna*.⁸³

(80) *Mucuna* Adans. | Plants of the World Online | Kew Science

<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:331783-2> (accessed Jul 25, 2017).

(81) *Mucuna pruriens* (velvet bean) <http://www.cabi.org/isc/datasheet/35134> (accessed Jul 25, 2017).

(82) Moura, T. M. de; Zamora, N. A.; Lewis, G. P.; Mansano, V. de F.; Tozzi, A. M. G. A. *Kew Bull.* **2013**, *68*, 151–155.

(83) Chaparro Acuña, S. P.; Aristizábal Torres, I. D.; Gil González, J. H. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*. scieloco **2009**, pp 4843–4853.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

A pesar de que la *Mucuna pruriens* tiene una calidad nutricional similar a la soja en cuanto a su proporción en proteínas, lípidos, minerales y otros nutrientes, esta legumbre solo se han utilizado como alimento tradicional en países como India, Filipinas, Nigeria, Ghana, Brasil y Malawi. Recientemente, estas judías están siendo explotadas como pienso para peces, aves de corral, cerdos y ganado después de haber sido sometidas a un procesamiento apropiado.⁸⁴ A su vez estudios realizados de los componentes anti-nutracéuticos de la *Mucuna* concluyen que con el tratamiento pertinente puede usarse perfectamente con como alimento.⁸⁵⁻⁸⁷

Las plantas superiores suelen liberar compuestos orgánicos al medio, como por ejemplo sus productos de descomposición, los cuales al agregarse a la matriz del suelo generan interacciones planta-planta. Estos compuestos activos, normalmente suprimen la germinación de las semillas, causan daño al crecimiento de las raíces y otros tejidos meristemáticos e inhiben el crecimiento de las plántulas.

La *Mucuna pruriens* es un ejemplo de un cultivo de cobertura exitoso ya que posee varios metabolitos secundarios altamente activos que son producidos por sus semillas, hojas y raíces. El principal compuesto fitotóxico es el ya comentado aminoácido no proteico L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), que como se indicó se utiliza en el tratamiento de los síntomas de la enfermedad de Parkinson. En otras plantas también se produce L-DOPA pero es usada como precursor de muchos alcaloides, catecolaminas y melanina, en cambio en la *Mucuna* esta se libera en los suelos, inhibiendo el crecimiento de las especies de plantas cercanas.⁴⁷ La alta concentración de L-Dopa es lo que supuso que ya desde el periodo védico (entre el 1500 a. C. y el 500 a. C. en la India) la harina de la *Mucuna* se haya estado utilizando para el tratamiento de Parkinson en la medicina ayurvedica.⁷⁹ Otro de los usos con eficacia probada de esta planta ha sido para el tratamiento de mordeduras de serpientes⁸⁸, incrementar la producción de hormona humana de crecimiento⁸⁹, también han sido estudiados sus efectos como afrodisiaco y sobre la fertilidad humana⁹⁰ o el alto poder antioxidante debido a la alta concentración de fenoles.⁹¹ Esto le ha supuesto a la *Mucuna pruriens* el sobre sobrenombre de judía mágica.

(84) Pugalenthi, M.; Vadivel, V.; Siddhuraju, P. *Plant Foods Hum Nutr* **2005** vol: 60 (4) pp: 201-218 .

(85) Patil, R. R.; Gholave, A. R.; Jadhav, J. P.; Yadav, S. R.; Bapa, V. A. *Genet. Resour. Crop Evol.* **2015** vol: 62 (1) pp: 155-162.

(86) Janardhanan, V. V. K. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2000**, 51 (4), 279–287.

(87) Carew, L. B. . H. D. . W. J. . A. F. . M. S. A. . G. A. . Z. E. I. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* **2003**, 1 (2-3).

(88) Tan, N. H.; Fung, S. Y.; Sim, S. M.; Marinello, E.; Guerranti, R.; Aguiyi, J. C. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, 123 (2), 356–358.

(89) Alleman, R. J.; Canale, R. E.; McCarthy, C. G.; Bloomer, R. J.; Bloomer, R. J. *Nutr. Metab. Insights* **2011**, 4, 55–63.

(90) Shukla, K. K.; Mahdi, A. A.; Ahmad, M. K.; Shankhwar, S. N.; Rajender, S.; Jaiswar, S. P. *Fertil. Steril.* **2009**, 92 (6), 1934–1940.

(91) Longhi, J. G.; Perez, E.; Lima, J. J. de; Cândido, L. M. B. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **2011**, 47 (3), 535–544.

1.8. CATECOLES

En el reino vegetal existen muchas familias de polifenoles clasificados como, alcoholes y ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos), flavonoides (flavonoles, flavones, flavanoles, flavanonas, isoflavonas, proanthiocianidinas) estilbenos y lignanos. Muchos de ellos juegan papeles principales en el desarrollo de la mayoría de las plantas y sus efectos en los tejidos vegetales pueden dividirse en las siguientes categorías⁸:

- Liberación y supresión de hormonas de crecimiento.
- Pantallas UV para proteger contra la radiación ionizante y para proporcionar coloración (pigmentos vegetales).
- Disuasión de los herbívoros (propiedades sensoriales).
- Prevención de infecciones microbianas (fitoalexinas).
- Moléculas de señalización en maduración y otros procesos de crecimiento.

Los benzenodiolos o dihidroxibencenos, son compuestos en los que dos grupos hidroxilo están sustituidos sobre un anillo de benceno. Estos compuestos aromáticos se clasifican como polifenoles. Existen tres isómeros de benzenodiol: 1,2-benzenodiol (el isómero orto) es comúnmente conocido como catecol, 1,3-benzenodiol (el meta isómero) comúnmente conocido como rescinol, y 1,4-benzenodiol (isómero para) comúnmente conocido como hidroquinona.

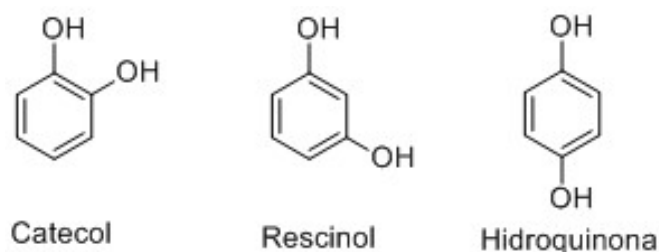


Figura 1.31. Isómeros del benzenodiol.

Los catecoles desempeñan un papel importante en muchos sistemas naturales. Se sabe que interactúan fácilmente con compuestos orgánicos (por ejemplo, aminoácidos) e inorgánicos (por ejemplo, iones metálicos, óxidos metálicos). La interacción con metales de los catecoles, o más bien su capacidad para formar complejos bidentados con hierro, hace que estructuras catecólicas se encuentren en muchos sideróforos. Estos compuestos transportadores de hierro son secretados por microorganismos para solubilizar el ion hierro Fe^{3+} que tiene muy poca solubilidad a pH neutro y por ende no puede ser utilizado por los organismos.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los sideróforos disuelven estos iones formando un complejo quelato para posteriormente reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , que pueden ser asimilados por mecanismos de transporte activo. Muchos sideróforos son péptidos no ribosomales. Los grupos principales de sideróforos incluyen los catecolatos (fenolatos), hidroxamatos y carboxilatos (por ejemplo, derivados del ácido cítrico).^{92,93}

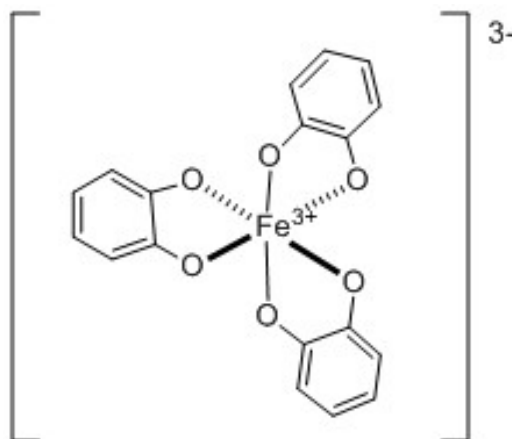


Figura. 1.32. Complejo de catecol con hierro.

Los catecoles están presentes en moléculas bioactivas esenciales para el metabolismo humano y para el desarrollo de las actividades fisiológicas normales, también están presentes actuando como unidades estructurales eficaces en muchos fármacos broncodilatadores, adrenérgicos, antiparkinsonianos y antihipertensivos.⁹⁴

En los seres humanos, el sistema de dopamina juega un papel central en varias condiciones médicas importantes, incluyendo el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), esquizofrenia y en adicciones.⁹⁵ La noradrenalina (o norepinefrina) es otra catecolamina con múltiples funciones fisiológicas y homeostáticas que puede actuar como hormona y como neurotransmisor. Las áreas del cuerpo que producen o se ven afectadas por la norepinefrina son descritas como noradrenérgicas.

(92) Hider, R. C.; Kong, X.; Murray, A.; Niyaz, N.; Ding, P.; Miller, M. J.; Malouin, F.; Ghosh, M.; Miller, M. J.; Malouin, F.; White, M. F.; Challis, G. L.; Naismith, J. H. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27 (5), 637.

(93) Aguado-Santacruz, G. A.; Moreno-Gómez, B.; Jiménez-Francisco, B.; García-Moya, E.; Preciado-Ortiz, Rev. Fitotec. Mex. **2012**, 35, 9-12.

(94) Tyman, J. H. P. *Synthetic and natural phenols*; Elsevier, **1996**, pp:700.

(95) Mogwitz, S.; Buse, J.; Ehrlich, S.; Roessner, V. In *International review of neurobiology*; **2013**; Vol. 112, pp 281–349.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Por otro lado, la 2-hidroxiestona es el estrógeno con estructura de catecol más abundante en el cuerpo, este metabolito juega un papel muy importante en la regulación de los ciclos femeninos de estrés y ciclo menstrual, también posee efectos anticancerígenos sobre el cáncer de mama.⁹⁶

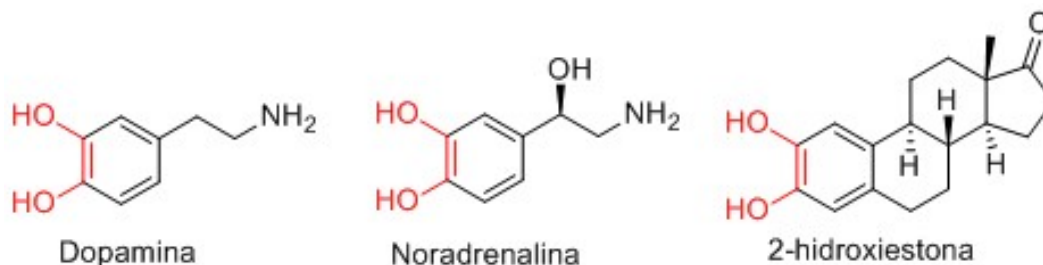


Figura 1.33. Algunos ejemplos de derivados de catecol en humanos.

En plantas existen estructuras catecólicas de cada una de las familias de los polifenoles y todos ellos muestran propiedades en las que el resto de catecol juega un papel principal en su actividad biológica. En polifenoles, el resto de catecol es necesario para la citoprotección en la quimiopreención del cáncer.⁹⁷ El ácido protocatequídico (PCA) es un ácido dihidroxibenzoico, un tipo de ácido fenólico. Es un importante metabolito que se encuentra en muchas verduras y también en el té verde. Se ha demostrado que el PCA posee actividades, antiinflamatorias, antihiper glucémicas y neuroprotectoras⁹⁸. Los datos experimentales sugieren que este ácido posee capacidad de modulación del entorno redox celular, las señales y las vías bioquímicas implicadas en el control de la inflamación y el estrés oxidativo. En consecuencia, PCA modula el equilibrio entre la supervivencia celular y la muerte celular. Vale la pena mencionar que PCA parece tener un comportamiento específico como un agente quimioterapéutico, sin efectos nocivos en las células normales. Sin embargo, muchas pruebas de tales propiedades se han recogido solo en estudios celulares y en animales, mientras que se carece de estudios clínicos.⁹⁹

Piceatannol (3, 3', 4, 5'-trans-trihidroxistilbeno), es un estilbeno, análogo catecólico de resveratrol, ha sido menos estudiado que resveratrol a pesar que también muestra un amplio espectro de actividades biológicas.¹⁰⁰ Piceatannol se encuentra en varias plantas, incluyendo uvas, maracuyá o té blanco. Además de los efectos antioxidantes, piceatannol presenta propiedades anticancerígenas potenciales, como sugiere su capacidad para suprimir la proliferación de una amplia variedad de células tumorales, incluyendo leucemia, linfoma; cáncer de mama, próstata, colon y melanoma.

(96) Bradlow, H. L.; Telang, N. T.; Sepkovic, D. W.; Osborne, M. P. *J. Endocrinol.* **1996**, *150 Suppl*, S259–S265.

(97) Lin, D.; Dai, F.; Sun, L.-D.; Zhou, B. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59* (12), 2395–2406.

(98) Deng, J.-S.; Lee, S.-D.; Kuo, W.-W.; Fan, M.-J.; Lin, Y.-M.; Hu, W.-S.; Huang, Y.-C.; Velmurugan, B. K.; Tsai, F.-J.; Tsai, C.-H.; Huang, C.-Y. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *209*, 77–84.

(99) Masella, R.; Santangelo, C.; D'Archivio, M.; Li Volti, G.; Giovannini, C.; Galvano, F. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (18), 2901–2917.

(100) Piotrowska, H.; Kucinska, M.; Murias, M. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2012**, *750* (1), 60–82.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La catequina y la epicatequina son dos flavonoides epímeros, siendo (-)-epicatequina y (+)-catequina los isómeros ópticos más comunes encontrados en la naturaleza. La catequina se aisló primero del extracto de planta catechu, del que deriva su nombre. Catequina que por descomposición térmica libera catecol, lo que explica el origen común del nombre de estos compuestos. (+)-catequina y (-)-epicatequina, así como sus conjugados de ácido gálico son componentes ubicuos en plantas vasculares, y componentes frecuentes de remedios herbales tradicionales. Las catequinas pueden actuar como agentes antitumorígenos, previenen la hepatotoxicidad, son beneficiosos para suprimir la obesidad inducida por la dieta alta en grasas modulando el metabolismo de los lípidos y también reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares.¹⁰¹⁻¹⁰³

Los lignanos son una clase de metabolitos secundarios que se encuentran en una gran variedad de plantas como fitoestrógenos. Aunque muchos lignanos poseen un anillo catecólico, uno de los alcoholes fenólicos siempre está en forma de éter metílico. En nuestro sistema digestivo, secoisolariciresinol y matairesinol, entre otros lignanos pueden ser metabolizados por microbios intestinales dando derivados monohidroxilados como enterolactona y enterodiol, los cuales poseen efectos beneficiosos para la salud en los seres humanos.¹⁰⁴ Estos derivados son fisiológicamente más activos que sus precursores.¹⁰⁵ A varios de estos productos se les supone actividad protectora contra el cáncer de mama en mujeres y cáncer de próstata en hombres, así como prevención de enfermedades cardiovasculares y afecciones asociadas con la menopausia.^{106,107}

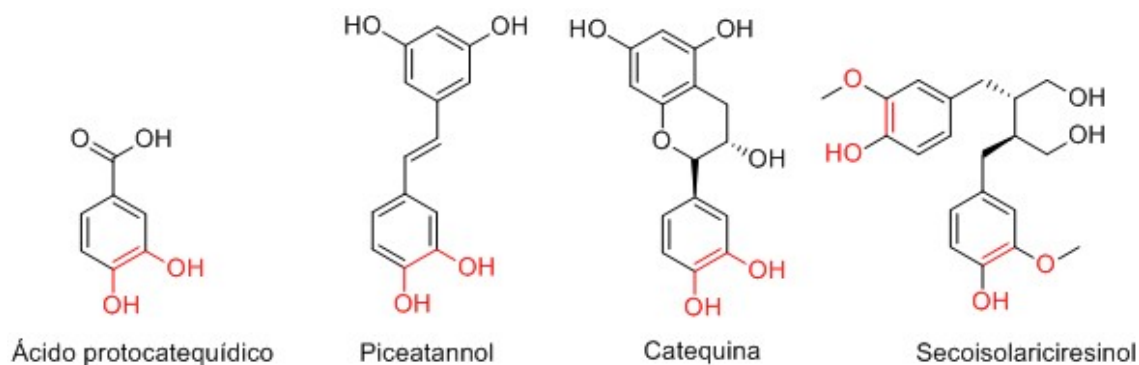


Figura 1.34. Algunos ejemplos de derivados de catecol en distintas familias de polifenoles

(101) Ellinger, S.; Reusch, A.; Stehle, P.; Helfrich, H.-P. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *95* (6), 1365–1377.

(102) Crespy, V.; Williamson, G. *J. Nutr.* **2004**, *134* (12 Suppl), 3431S – 3440S.

(103) Hooper, L.; Kay, C.; Abdelhamid, A.; Kroon, P. A.; Cohn, J. S.; Rimm, E. B.; Cassidy, A. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *95* (3), 740–751.

(104) Adlercreutz, H. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2007**, *44* (5-6), 483–525.

(105) Axelson, M.; Sjövall, J.; Gustafsson, B. E.; Setchell, K. D. R. *Nature* **1982**, *298* (5875), 659–660.

(106) Thompson, L. U.; Boucher, B. A.; Liu, Z.; Cotterchio, M.; Kreiger, N. *Nutr. Cancer* **2006**, *54* (2), 184–201.

(107) Wang, L.-Q. *J. Chromatogr. B* **2002**, *777* (1-2), 289–309.

Reactividad del Anillo Catecólico

Los fenoles, al igual que los alcoholes alifáticos, son líquidos o sólidos a temperatura ambiente, de color blanco o incoloro. Son moléculas polares, aunque su solubilidad en agua no es muy elevada, en disoluciones básicas aumenta bastante. El comportamiento químico de los fenoles es diferente en algunos aspectos del de los alcoholes, por lo que es razonable tratarlos como un grupo similar pero característicamente distinto. Las reacciones de sustitución nucleofílica y eliminación son comunes para los alcoholes alifáticos, pero no se producen sobre los hidroxilos fenólicos.

Mientras el carácter ácido de los alcoholes es tan débil que, para fines normales de laboratorio, puede ser ignorado. El hidrogeno del fenol es suficientemente ácido para que tenga propiedades reconociblemente ácidas, teniendo la constante de acidez propia de un ácido débil. Hay varios motivos que explican este comportamiento. Una explicación es la estabilización por resonancia del anión fenóxido por el anillo aromático. De esta manera, la carga negativa sobre el oxígeno es deslocalizada sobre los átomos de carbono orto y para. Otra explicación, el aumento de la acidez es el resultado de la superposición orbital entre los pares solitarios del oxígeno y el sistema aromático. Una tercera explicación sería por el efecto inductivo de los carbonos con hibridación sp^2 que permite una gran estabilización del oxianión.

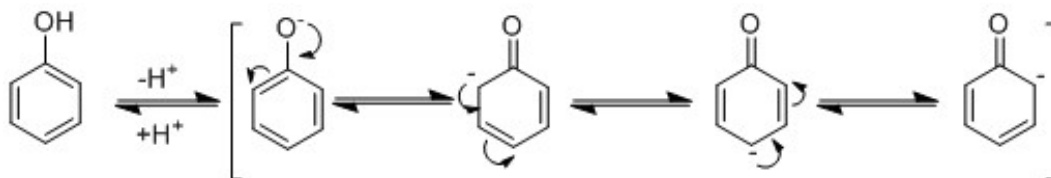


Figura 1.35. Deslocalización de los electrones en una estructura fenólica.

Así pues, en los fenoles se van a dar reacciones que implican al hidroxilo, reacciones tipo ácido-base o reacciones redox, y también reacciones sobre el anillo aromático debido a la activación por efecto resonante de hidroxilo. Algunas de las reacciones como alcohol que se van dar entre otras son, la formación de ésteres o de éteres. La formación de éteres de fenoles es especialmente fácil mediante síntesis de Williamson, con una base moderadamente fuerte se genera el fenóxido, cuya carga está deslocalizada (y estabilizada) por interacción con el anillo aromático. El fenóxido es capaz de atacar a un electrófilo para dar lugar, mediante una sustitución nucleofílica, al éter correspondiente.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los fenoles, como los alcoholes, reaccionan con derivados de ácidos carboxílicos (anhídridos y haluros de ácido) para dar ésteres. Uno de los ésteres de fenol más importantes es la Aspirina o ácido acetilsalicílico, que se forma por reacción del ácido salicílico con anhídrido acético en medio ácido. Los fenoles dan reacciones de sustitución electrófila aromática con suma facilidad, debido a que el grupo OH de un fenol aumenta la densidad electrónica del anillo aromático al que esté unido. Las posiciones con mayor densidad electrónica son la orto y la para, y esas serán las atacadas por el electrófilo. La bromación por ejemplo es tan fácil que se da incluso sin catalizador y es difícil de detener en la mono o dibromación a temperatura ambiente. La nitración también se da más fácilmente que en el benceno: sin necesidad de ácido sulfúrico, la reacción de nitración es lo que le va conferir a los polifenoles su capacidad biológica para captar especies reactivas de nitrógeno.¹⁰⁸

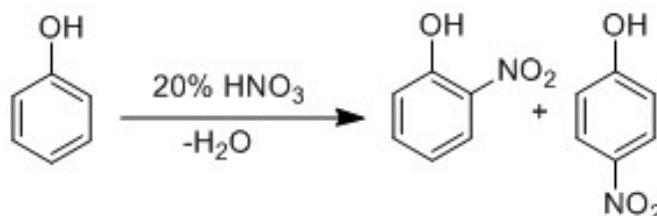


Figura 1.36. Nitración de fenol en condiciones suaves.

Las quinonas son compuestos orgánicos muy importantes que proceden de la oxidación de fenoles. Para obtener una quinona debe partirse de un benzenodiol. Su oxidación se produce en condiciones muy suaves ya que las quinonas, aunque no son aromáticas, poseen una estructura muy conjugada y, por tanto, muy estable. La hidroquinona es utilizada como agente reductor en el revelado de imágenes fotográficas, para reducir los iones plata de la emulsión a plata metálica y dar lugar a las partes oscuras de un negativo. Las quinonas pueden reducirse a fenoles con reductores suaves. Por tanto la transformación fenol-quinona es una reacción redox reversible que puede efectuarse en un sentido u otro dependiendo de las condiciones de reacción. El mecanismo de la oxidación de fenoles a quinonas (o de la reducción de quinonas a fenoles) puede explicarse mediante cesión o aceptación de dos electrones en pasos consecutivos. Las quinonas son excelentes dienófilos en la reacción de Diels-Alder.

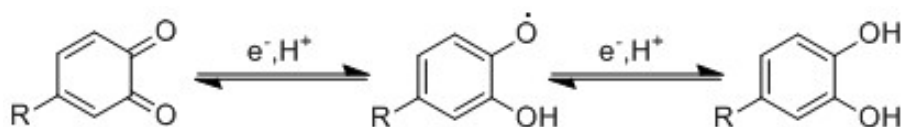


Figura 1.37. Equilibrio entre quinona y polifenol.

(108) de la Puerta, R.; Domínguez, M. E. M.; Ruíz-Gutiérrez, V.; Flavill, J. A.; Hoult, J. R. S. *Life Sci.* **2001**, *69* (10), 1213–1222.

1.9. DERIVATIZACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES.

La derivatización es la técnica mediante la cual partiendo de una molécula llamada precursor se obtienen productos modificados funcional o estructuralmente. El nuevo producto que posee una estructura química similar es llamado derivatizado o derivados.

Habitualmente, la derivatización se lleva a cabo aprovechando un grupo funcional del precursor para formar un derivado que posee propiedades modificadas como reactividad química y biológica, aumento o disminución de la solubilidad, modificación de los puntos de fusión y ebullición, cambio de estado de agregación o polaridad diferentes a las del precursor original. Estas nuevas propiedades físicas y químicas pueden ser utilizadas para la cuantificación o separación de productos. La derivatización puede mejorar las actividades biológicas propias del precursor o incluso puede ofrecer actividades nuevas. Debido a la enorme variedad de las estructuras de los productos naturales, estos pueden interactuar en muchos procesos biológicos, bien en interacciones sencillas o en reacciones las más complejas como pueden ser las interacciones proteína-proteína.

Durante la década de 1990 se diseñaron métodos innovadores que supusieron el auge de la derivatización de productos naturales, gracias a los nuevos métodos de extracción e identificación y a la revolución de la química combinatoria.^{109,110} El origen fue por la necesidad planteada en el desarrollo de nuevos medicamentos, cuyo principio activo debe ser sometido a un largo procedimiento de selección y ensayos biológicos. El tiempo promedio para completar el proceso de crear un medicamento apto para uso humano es de alrededor de doce años, con un costo medio de unos 500 millones de dólares. Se estima que para cada nuevo fármaco efectivamente comercializado se evalúan unos cien mil compuestos.¹¹¹

La derivatización química está orientada a la creación de librerías con cientos de derivados a los que posteriormente será estudiada su actividad. Para obtener un gran número de productos que realmente tengan buena actividad biológica se diseñó una nueva vertiente en la química combinatoria denominada “Diversity Oriented Synthesis” (DOS). Esta técnica está basada en la creación de librerías a partir de un producto que en muchos casos es de origen natural y con de reconocida actividad biológica. Otra forma de proceder es buscar productos naturales cuya estructura se asemeje a las estructuras de metabolitos biológicamente activos.

(109) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J Nat Prod.* **2007**, 70(3), 461-77

(110) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75 (3), 311–335.

(111) César Barbero; Ricardo Furlán; Ernesto mata. *Cienc. Hoy.* **2011** 21,. 39 - 45.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En la actualidad las dos vertientes se siguen usando, pero donde los resultados están siendo mejores es cuando las librerías son creadas con el fin de amplificar el efecto de una actividad específica.¹¹² A día de hoy existen muchos derivados de productos naturales que están siendo estudiados, otros están ya comercializados, muchos se encuentran en fase preclínica o clínica y otros en plena fase de desarrollo. Así cabe destacar la artemisinina, y sus derivados semisintéticos, un grupo de fármacos utilizados contra la malaria de *Plasmodium falciparum* gracias a los cuales se han salvado millones de vidas. Estos derivados fueron descubiertos por Tu Youyou, una científica, médica y química farmacéutica china, que ganó el Premio Nobel de Medicina de 2015.¹¹³

Otro ejemplo es el de la camptotecina, que se obtiene de la corteza y las hojas del árbol de origen chino *Camptotheca acuminata* del cual se han realizado numerosos derivados análogos, entre ellos el topotecan e irinotecan, estos dos compuestos recibieron la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos americana (FDA) para su uso contra los cánceres de ovario, pulmón, mama y colon.¹¹⁴

Cabe citar, la tigeciclina es el derivado 9-tertbutil-glicilamido de la minociclina, que es un producto semisintético de la clortetraciclina aislada de *Streptomyces aureofaciens*. La tigeciclina mostró actividad antibacteriana típica de otras tetraciclinas, pero con una actividad más potente contra organismos resistentes a la tetraciclina.¹¹⁵

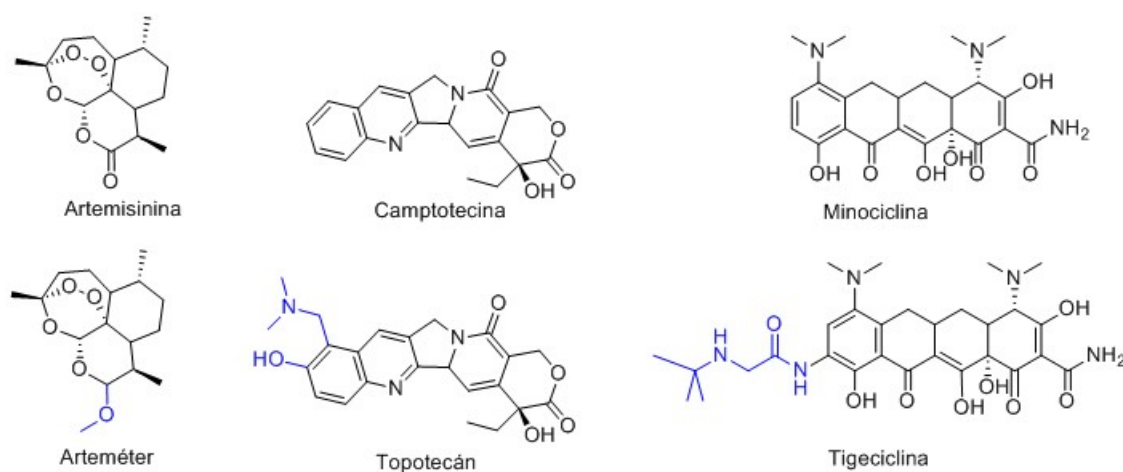


Figura 1.38. Estructuras de los productos naturales citados y sus derivados.

(112) Newman, D. J. *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (9), 2589–2599.

(113) Krungkrai, J.; Krungkrai, S. R. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2016**, 6 (5), 371–375.

(114) Basili, S.; Moro, S. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, 19 (5), 555–574.

(115) Balunas, M. J.; Chai, H. B.; Kinghorn, A. D. **2006**, 8 (2), 39–53.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los derivados que se obtienen por semisíntesis de productos naturales son denominados como derivados de primera generación. Como indica la DOS, se plantea que tras una vez obtenidos los productos con actividad biológica, esta puede ser mejorada sintetizando nuevos productos por medio de reacciones subsiguientes. A estos nuevos derivados obtenidos pasan a ser derivados de segunda generación.

Algunos ejemplos de productos de segunda generación son los derivados de andrografolida, quinina o incluso de ácido betulínico, del cual uno de sus derivados tiene efectividad frente al VIH conocido como Bevirimat.¹¹⁶ El Bevirimat es un inhibidor de la maduración del VIH. Varios derivados de segunda generación del Bevirimat están siendo estudiados y muestran actividad anti-VIH mejorada puesto que la nueva derivatización le confiere a los productos inhibición en la entrada del virus.¹¹⁷

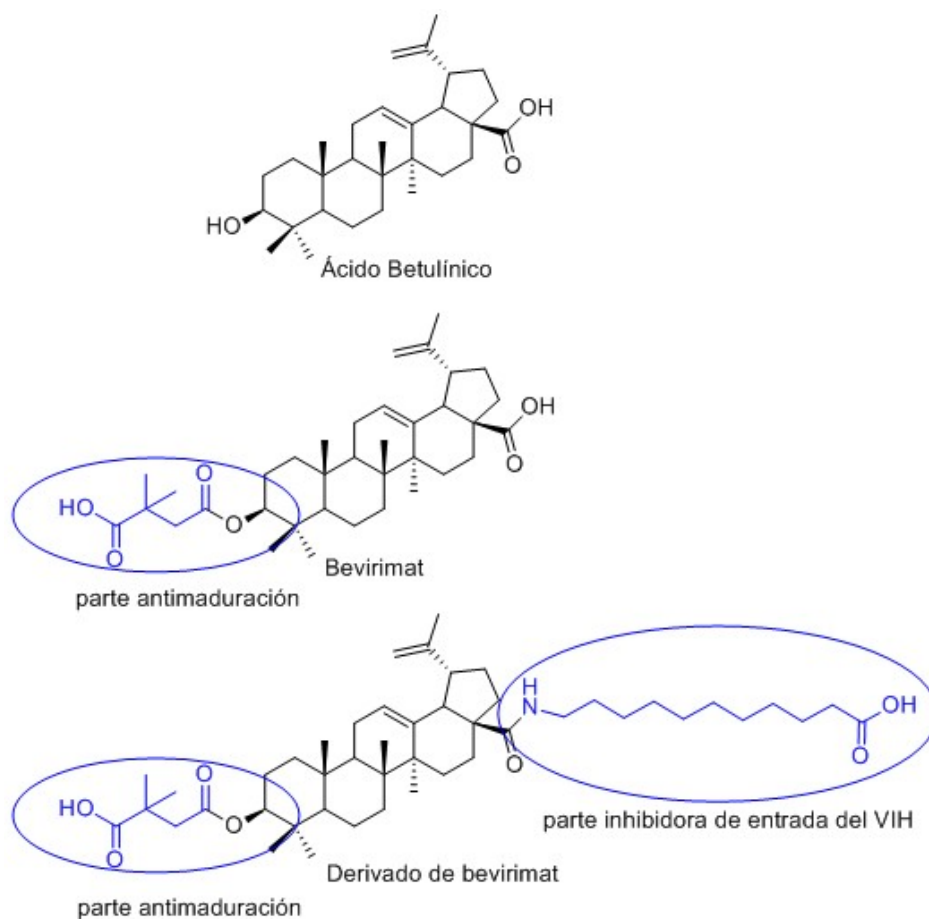


Figura 1.39. Derivados de ácido betulínico.

(116) Martin, D.; Salzwedel, K.; Allaway, G. *Antivir. Chem. Chemother.* 19, 107–113.

(117) Aiken, C.; Chen, C. H. *Trends Mol. Med.* 2005, 11 (1), 31–36.

Derivatización de Polifenoles

Debido a las inherentes actividades farmacológicas y su disponibilidad en la naturaleza muchos polifenoles son considerados hoy en día como buenos sustratos sobre los que llevar a cabo modificaciones sintéticas. Las modificaciones químicas sobre estos productos suelen dirigirse a la modificación de los centros activos de los polifenoles, modificándose los hidroxilos fenólicos, sustituyendo el anillo aromático, o derivatizando otra parte de la molécula. En general, las modificaciones covalentes de polifenoles representan un medio para aumentar la potencia biológica de estos compuestos *in vitro* y su biodisponibilidad *in vivo*, y por lo tanto pueden mejorar las actividades de prevención de enfermedades de dichos compuestos.

Entre los polifenoles más estudiados se encuentra resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxi-trans-estilbeno) un estilbenoide presente en la piel de las uvas, arándanos, frambuesas y moras, del cual se han realizado un número ingente de estudios sobre sus propiedades biológicas, también ha sido ampliamente derivatizado, lo cual ha permitido entender mejor su actividad en sistemas biológicos. Cuando se hidroxila resveratrol se observa aumento espectacular (6600 veces) en su actividad antirradicalaria.¹¹⁸ Sus actividades citotóxicas, antiproliferativas y proapoptóticas también fueron significativamente mejorado, como fue demostrado para la leucemia¹¹⁹ y células de melanoma.¹²⁰

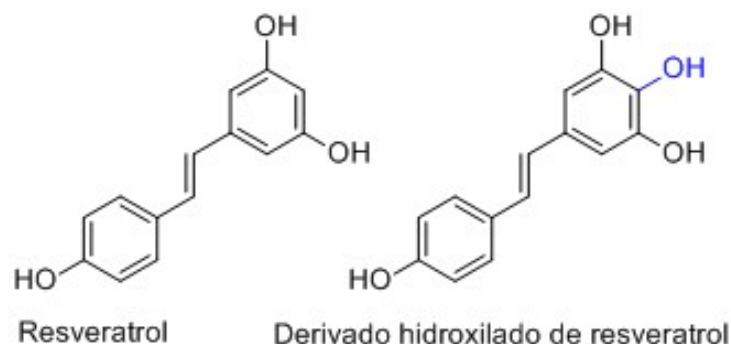


Figura 1.40. Resveratrol y derivado hidroxilado.

(118) Murias, M.; Jäger, W.; Handler, N.; Erker, T.; Horvath, Z.; Szekeres, T.; Nohl, H.; Gille, L. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69* (6), 903–912.

(119) Horvath, Z.; Murias, M.; Saiko, P.; Erker, T.; Handler, N.; Madlener, S.; Jaeger, W.; Grusch, M.; Fritzer-Szekeres, M.; Krupitza, G.; Szekeres, T. *Exp. Hematol.* **2006**, *34* (10), 1377–1384.

(120) Paulitschke, V.; Schicher, N.; Szekeres, T.; Jäger, W.; Elbling, L.; Riemer, A. B.; Scheiner, O.; Trimurtulu, G.; Venkateswarlu, S.; Mikula, M.; Swoboda, A.; Fiebigler, E.; Gerner, C.; Pehamberger, H.; Kunstfeld, R. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130* (6), 1668–1679.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Crisina es una 3,7 dihidroxiflavona natural que se encuentra en las flores de *Passiflora caerulea* y *Passiflora incarnata*, estudios han demostrado que el producto de la metilación total de esta flavona es un agente antiproliferativo marcadamente más fuerte hacia las células de diversos tipos de cáncer, que la misma crisina.¹²¹ Del mismo modo, la metilación de la curcumina se convirtió en un inhibidor más fuerte del crecimiento de células de cáncer de colon y el inductor de su apoptosis en comparación con la curcumina sin modificar.¹²² En algunos casos la metilación hace que disminuya el efecto antioxidante de algunos polifenoles.^{123,124}

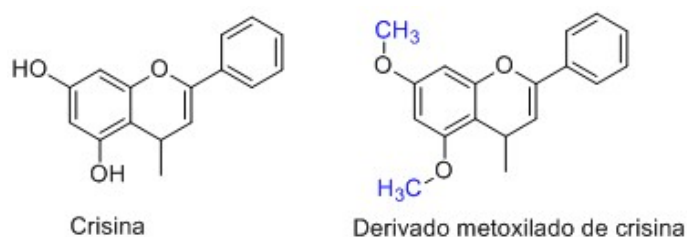


Figura 1.41. Derivatización de crisina.

El principal ingrediente activo contenido en el té verde es el galato de epigalocatequina (EGCG), una catequina que pertenece a la familia de los polifenoles. Los derivados acilados de EGCG exhibieron actividades anticancerosas considerablemente más altas hacia las células de leucemia, cáncer de esófago y células de cáncer de mama que el compuesto original. También fueron más eficientes en un modelo de ratón de cáncer de mama.¹²⁵ Y se aumentó su poder antioxidante.¹²⁶

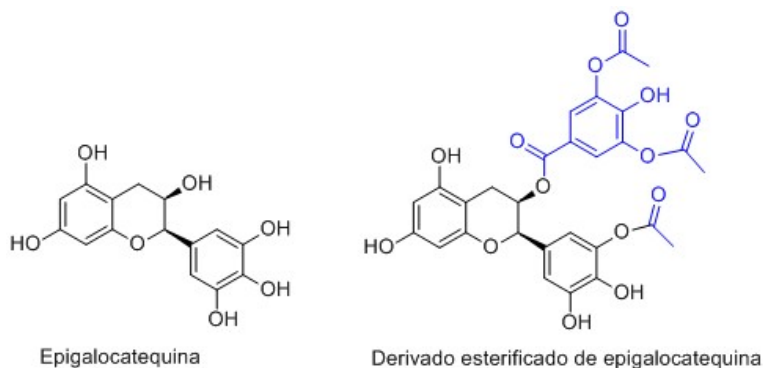


Figura 1.42. Derivado de epigalocatequina.

(121) Walle, T.; Ta, N.; Kawamori, T.; Wen, X.; Tsuji, P. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73* (9), 1288–1296.

(122) Tamvakopoulos, C.; Dimas, K.; Sofianos, Z. D.; Hatziantoniou, S.; Han, Z.; Liu, Z.-L.; Wyche, J. H.; Pantazis, P. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (4), 1269–1277.

(123) Chen, L.; Chen, L.; Wang, T.; Yuan, P.; Chen, K.; Jia, J.; Li, Y. *J. Food Sci.* **2016**, *81* (5), C1062–C1069.

(124) Wang, P.; Heber, D.; Henning, S. M. .

(125) Lewandowska, U.; Fichna, J.; Gorch, S. *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *109*, 1–13.

(126) Zhu, S.; Li, Y.; Li, Z.; Ma, C.; Lou, Z.; Yokoyama, W.; Wang, H. *Food Res. Int.* **2014**, *56*, 279–286.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Derivados acetilados de hidroxitirosol demostraron ser tan eficaces como el compuesto nativo, en la prevención de alteraciones oxidativas moleculares debidas a ROS y en estudios de citotoxicidad en células humanas, a pesar de que están carentes completamente de actividad antioxidante al tener los hidroxilos fenólicos bloqueados en forma de ester.¹²⁷ La esterificación de resveratrol mediante la adición de dos moléculas de ácido gálico, aumentó las actividades inhibitoras del crecimiento y proapoptóticas tanto del resveratrol como del ácido gálico hacia las células de cáncer de colon.¹²⁸ Este digaloilresveratrol también demostró que inhibe la formación de colonias por células de cáncer pancreático más fuertemente que ambos compuestos de origen.¹²⁹

Otra forma de derivatizar compuestos es mediante la dimerización, este proceso se ha llevado a cabo en varios polifenoles con el fin de conocer mejor la relación estructura-actividad. La dimerización se puede realizar vía radicalaria o bien mediante la utilización de un linker. Estudios realizados con dímeros de epicatequina demostraron que en dímeros las actividades sobre el virus del herpes, anti-HIV, e incluso de eliminación de radicales eran mayor en estos que en la propia epicatequina.¹³⁰

También algunos dímeros se dan de manera natural en algunos organismos, como la ξ -viniferina, este dímero de resveratrol cuya concentración en el vino está comprendida entre 0.1 y 4.3 mg/L. De este compuesto se han demostrado in vitro actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticarcinógenas y cardioprotectoras.¹³¹

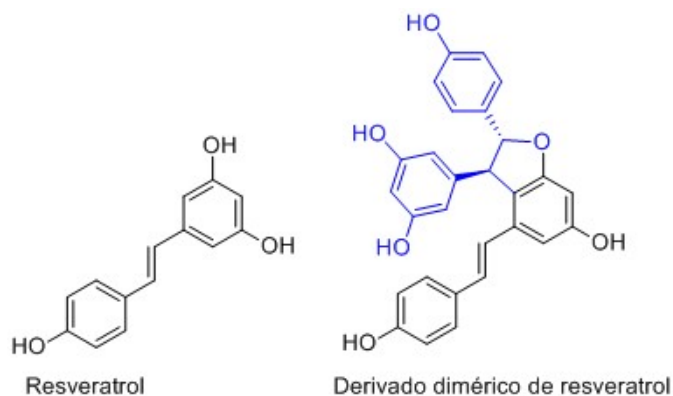


Figura 1.43. Resveratrol y derivado dimerizado.

(127) Caterina Manna, *,†; Valentina Migliardi, †; Filomena Sannino, §; Antonio De Martino, §. and; Capasso, R. **2005**. 53 (24), 9602–9607

(128) Bernhaus, A.; Fritzer-Szekeres, M.; Grusch, M.; Saiko, P.; Krupitza, G.; Venkateswarlu, S.; Trimurtulu, G.; Jaeger, W.; Szekeres, T. *Cancer Lett.* **2009**, 274 (2), 299–304.

(129) Saiko, P.; Graser, G.; Giesrigl, B.; Steinmann, M.-T.; Schuster, H.; Lackner, A.; Grusch, M.; Krupitza, G.; Jaeger, W.; Somepalli, V.; Golakoti, T.; Fritzer-Szekeres, M.; Szekeres, T. *Invest. New Drugs* **2013**, 31 (5), 1115–1124.

(130) Tess De Bruyne, *,†; Luc Pieters, †; Myriam Witvrouw, ‡; Erik De Clercq, ‡; Dirk Vanden Berghe, † and; Vlietinck, A. J. **1999**. 62 (7), 954-958.

(131) Courtois, A.; Jourdes, M.; Dupin, A.; Lapèze, C.; Renouf, E.; Biais, B.; Teissedre, P.-L.; Mérillon, J.-M.; Richard, T.; Krisa, S. *Molecules* **2017**, 22 (5), 733.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La glicosilación es un proceso bioquímico en el que se adiciona un glúcido a otra molécula. Cuando la glicosilación se realiza sobre un grupo alcohol o tiol, al proceso se le denomina glucosidación, y la molécula resultante se denomina glucósido. En la naturaleza se dan muchos polifenoles glucosilados, pero también se han desarrollado metodologías para el estudio de los glucósidos sintéticos. La biosíntesis de estos compuestos es importante para el descubrimiento de nuevos fármacos dado que muchos de estos derivados poseen actividades biológicas mejoradas.

Existen diversos estudios sobre derivados glucosilados de la genisteína, un fitoestrógeno que pertenece a la categoría de las isoflavonas. Algunos de estos derivados han demostrado tener una potente actividad antifúngica.¹³² También otro derivado con un azúcar en posición 8 mostro actividad supresora sobre las células de adenocarcinoma de ovario, incluyendo la inhibición de la proliferación, la inducción de la apoptosis, el colapso del potencial de la membrana mitocondrial y la generación de ROS.¹³³

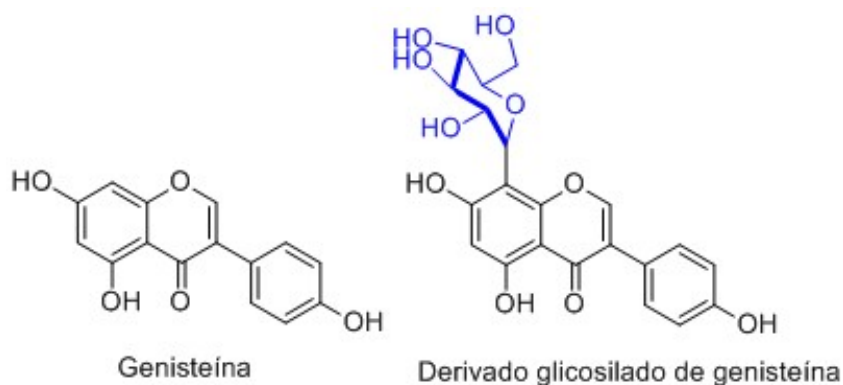


Figura 1.44. Genisteína y derivado glicosilado.

(132) Parajuli, P.; Pandey, R. P.; Huyen Nguyen, T. T.; Shrestha, B.; Yamaguchi, T.; Sohng, J. K. *RSC Adv.* **2017**, 7 (26), 16217–16231.

(133) Antosiak, A.; Milowska, K.; Maczynska, K.; Rozalska, S.; Gabryelak, T. *Med. Chem. Res.* **2017**, 26 (1), 64–73.

1.10. ANTIOXIDANTES

Las especies de oxígeno reactivo (ROS) y otros radicales están involucradas en una variedad de fenómenos biológicos nocivos, tales como mutación, carcinogénesis, enfermedades degenerativas, inflamación, envejecimiento y enfermedades del desarrollo. Las actividades metabólicas en células aeróbicas normales producen ROS, estas especies juegan un papel importante en la prevención de enfermedades ayudando al sistema inmunitario, mediando la señalización celular y desempeñando un papel esencial en la apoptosis. No obstante, el estrés ambiental puede hacer que los niveles normales de ROS aumenten en gran manera, este exceso genera daños significativos a las estructuras celulares afectando de manera negativa a importantes macromoléculas en las células.^{134,135}

Más del 95% del O₂ consumido por los organismos aerobios es reducido completamente a H₂O durante la respiración mitocondrial, pero un pequeño porcentaje (< 5 %) es convertido a ROS. La reducción del oxígeno singlete molecular (¹O₂ una forma metaestable excitada del oxígeno triplete) produce superóxido (O₂⁻) y este es el precursor de la mayoría de las otras especies reactivas del oxígeno.¹³⁶

Las ROS las podríamos clasificar según su procedencia como:

- Endógenas, se producen intracelularmente a través de múltiples mecanismos y dependiendo de los tipos de tejido o de la célula, este tipo de ROS principalmente se producen en las membranas celulares, las mitocondrias, los peroxisomas y el retículo endoplásmico.¹³⁷

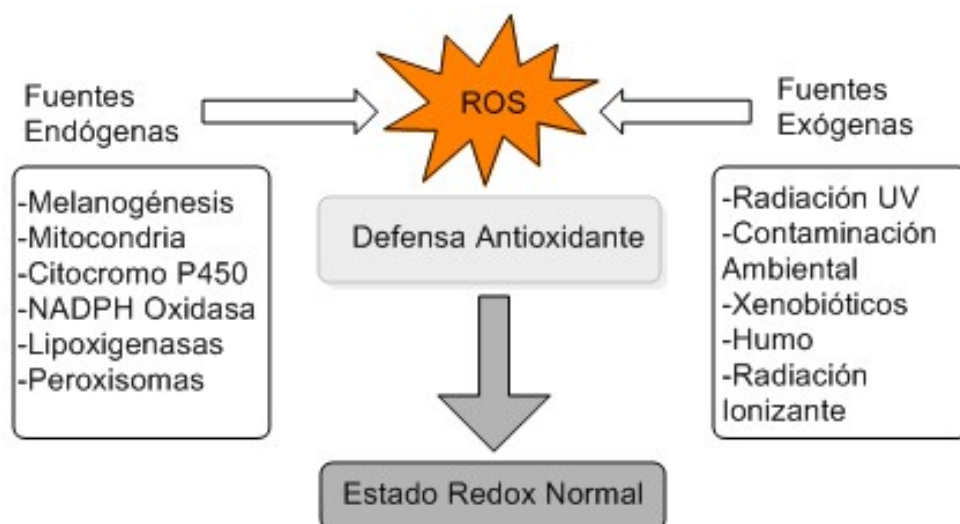


Figura 1.45. ROS.

(134) Kohen, R.; Nyska, A. *Toxicol. Pathol.* **2002**, *30* (6), 620–650.

(135) Seifried, H. E.; Anderson, D. E.; Fisher, E. I.; Milner, J. J. *Nutr. Biochem.* **2007**, *18* (9), 567–579.

(136) Turrens, J. F. *J. Physiol.* **2003**, *552* (Pt 2), 335–344.

(137) Muller, F. *J. Am. Aging Assoc.* **2000**, *23* (4), 227–253.

- Las ROS exógenas pueden producirse a partir de contaminantes, tabaco, humo, drogas, xenobióticos o radiación. La radiación ionizante puede generar intermediarios dañinos a través de la interacción con el agua, un proceso denominado radiólisis. Dado que el agua comprende 55-60% del cuerpo humano, la probabilidad de radiólisis es bastante alta en presencia de radiación ionizante.¹³⁸

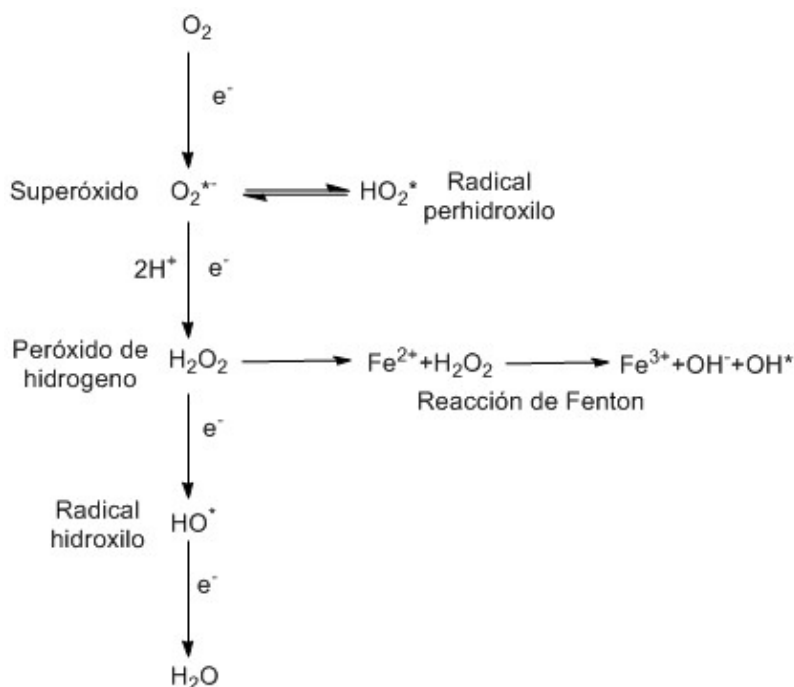


Figura 1.46. Formación de ROS.

Algunos de las ROS más comunes son, el ion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical perhidroxilo (HO_2^{\bullet}) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}).¹³⁹

Se define antioxidante como “cualquier sustancia que, presente en pequeñas concentraciones comparadas con el sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato”.¹⁴⁰ El propósito de los antioxidantes en un entorno fisiológico es evitar que las concentraciones de ROS alcancen un nivel lo suficientemente alto dentro de una célula para que se produzcan daños. Los antioxidantes celulares pueden ser enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) o no enzimáticos (glutatión, tioles, algunas vitaminas y metales, o fitoquímicos como isoflavonas, polifenoles y flavonoides).

(138) Riley, P. A. *Int. J. Radiat. Biol.* **1994**, 65 (1), 27–33.

(139) Benezzer, M.; Castro–Mercado, E.; García–Pineda, E. *Rev. Mex. Fitopatol.* **2008**, 26 (1), 56–61.

(140) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine.* **2015** pp: 944.

Al igual que las ROS los antioxidantes podemos catalogarlos como:

- Endógenos, que a su vez pueden clasificarse como antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos. Las principales enzimas antioxidantes directamente implicadas en la neutralización de ROS son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRx). SOD, es la primera línea de defensa contra los radicales libres, esta enzima cataliza la dismutación del superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por reducción. El H_2O_2 se transforma en agua y oxígeno O_2 por catalasa (CAT) o glutatión peroxidasa (GPx). La enzima selenoproteína GPx elimina el H_2O_2 al utilizarlo para oxidar el glutatión reducido (GSH) en glutatión oxidado (GSSG). Glutatión reductasa, una enzima flavoproteína, regenera GSH de GSSG, con NADPH como una fuente de poder reductor. Además del peróxido de hidrógeno, GPx también reduce los hidroperóxidos lipídicos o no lípidos mientras que la oxidación del glutatión (GSH).¹⁴¹

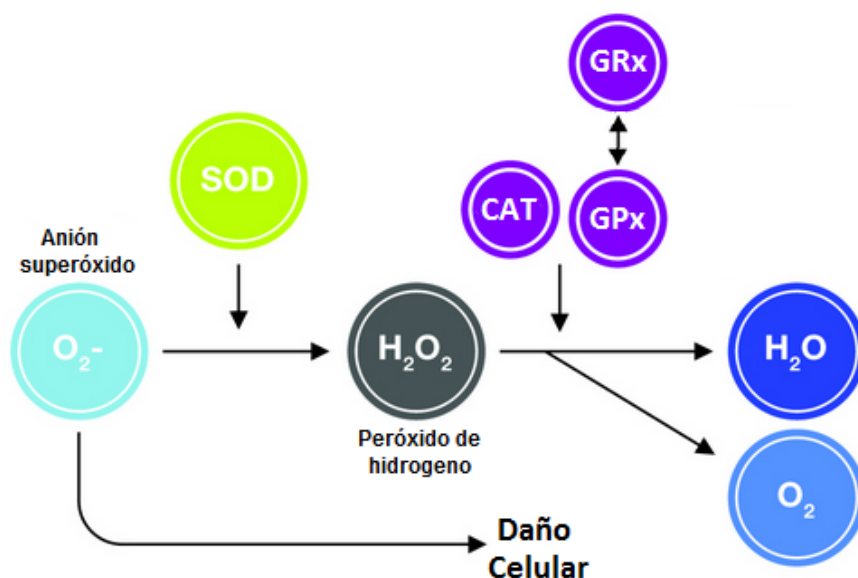


Figura 1.47. Actuación de los antioxidantes endógenos.

Los antioxidantes endógenos no enzimáticos, suelen estar presentes en bajas concentraciones, se ubican principalmente en el citosol, la matriz mitocondrial y los fluidos extracelulares, estos incluyen el ácido lipoico, glutatión, L-arginina, coenzima Q10, melatonina, ácido úrico, bilirrubina, etc. La dieta puede también contener dichos antioxidantes.

(141) Pham-Huy, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. *Int. J. Biomed. Sci.* **2008**, 4 (2), 89–96.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

- Los antioxidantes exógenos aquellos que son aportados, bien de forma natural a través de la dieta, o bien a través de otras vías. Aunque como se ha visto las células tienen autoprotección frente a las ROS, nuestros sistemas endógenos de defensa antioxidante están incompletos sin compuestos reductores exógenos como la vitamina C, vitamina E, carotenoides y polifenoles. Todos ellos juegan un papel esencial en muchos mecanismos antioxidantes en organismos vivos. Por lo tanto, existe una demanda continua de antioxidantes exógenos con el fin de prevenir el estrés oxidativo.¹⁴² Estos antioxidantes pueden ser clasificados en las siguientes categorías:

- Vitaminas antioxidantes, son un grupo de agentes reductores capaces de donar electrones a ROS, radicales libres y lipoperóxidos, neutralizando de esta manera el potencial oxidativo. Entre estas vitaminas encontramos ácido ascórbico (Vitamina C), α -tocoferol (Vitamina E) y β -caroteno (o pro-vitamina A).¹⁴³ Además de su acción antioxidante, las vitaminas son nutrientes necesarios para la regulación de muchas funciones diferentes del cuerpo. Son importantes para la formación de tejidos, células de la sangre, material genético, hormonas y sustancias químicas para el sistema nervioso. Las vitaminas pueden ser catalizadores o coenzimas.

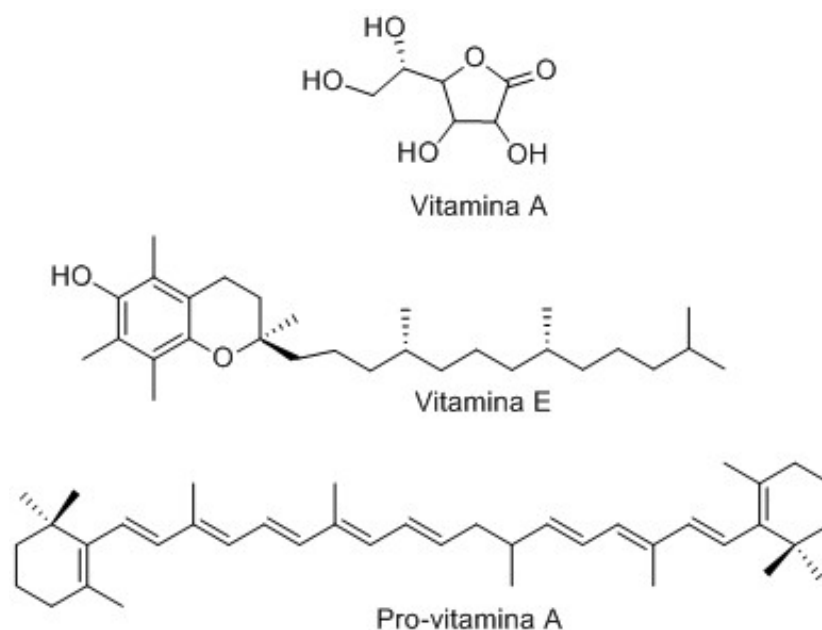


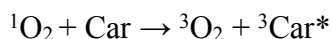
Figura 1.48. Vitaminas.

(142) Bouayed, J.; Bohn, T. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2010**, 3 (4), 228–237.

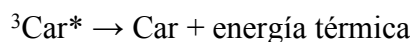
(143) Chao, J. C.-J.; Yuan, M. D.; Chen, P. Y.; Chien, S. W. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, 13 (11), 653–663.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

- Carotenoides, son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias. Carotenoides, tales como el β -caroteno, licopeno, zeaxantina, luteína y cantaxantina. El mecanismo de acción viene de la posibilidad de extinguir oxígenos singlete $^1\text{O}_2$, esto supuso un importante avance para comprender como los pigmentos carotenoides pueden prevenir la alteración de sistemas fotobiológicos.¹⁴⁴ La desactivación del $^1\text{O}_2$ por los carotenoides supone la transferencia de energía desde el $^1\text{O}_2$ a los carotenoides, que resulta en la formación de un oxígeno en estado fundamental $^3\text{O}_2$ y un carotenoide triplete excitado $^3\text{Car}^*$:



El estado fundamental del caroteno se consigue de nuevo por disipación de energía, a través de interacciones rotacionales y vibracionales entre el $^3\text{Car}^*$ y el solvente:



Se estima que una molécula de β -caroteno puede extinguir hasta 1000 moléculas de oxígeno singlete.

- Polifenoles, son los antioxidantes más abundantes en la dieta. Su ingesta dietética total puede llegar a 1 gramo por día, este valor es mucho mayor que la de todas las otras clases de fitoquímicos y antioxidantes dietéticos conocidos. Para poner en perspectiva, esto es aproximadamente 10 veces mayor que la ingesta de vitamina C y 100 veces mayor que la ingesta de vitamina E y carotenoides.¹⁴⁵ Sus principales fuentes dietéticas son las frutas y bebidas derivadas de las plantas, tales como zumos de frutas, té, café y vino tinto. Las verduras, cereales, chocolate y legumbres secas también contribuyen a la ingesta total de polifenoles. Durante las décadas de 1930 y 1950 los polifenoles fueron conocidos como vitamina P. Sin embargo, se vio que no eran esenciales por lo que fueron reclasificados.

Durante muchos años, se considero que la única acción de los polifenoles era la protección celular contra el daño oxidativo a través de la eliminación de los radicales libres. Sin embargo, este concepto ahora parece ser una visión simplificada de su modo de acción.¹⁴⁶

(144) Foote, C. S.; Chang, Y. C.; Denny, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (17), 5216–5218.

(145) Scalbert, A.; Johnson, I. T.; Saltmarsh, M. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81* (1 Suppl), 215S – 217S.

(146) Azzi, A.; Davies, K. J. A.; Kelly, F. *FEBS Lett.* **2004**, *558* (1-3), 3–6.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las células responden a los polifenoles principalmente a través de interacciones directas con receptores o enzimas implicadas en la transducción de señales, lo que puede generar como resultado la modificación del estado redox de la célula y desencadenando una serie de reacciones redox dependientes.¹⁴⁷ Se han descrito efectos antioxidantes y prooxidantes de los polifenoles, con efectos contrastados en los procesos fisiológicos celulares. Como antioxidantes, los polifenoles pueden mejorar la supervivencia celular; mientras como prooxidantes, pueden inducir la apoptosis y prevenir el crecimiento tumoral.¹⁴⁸

-Existen otros compuestos antioxidantes que no entrarían en las tres categorías anteriores, como algunos compuestos triterpénicos como los ácidos ursólico, oleanólico y maslínico han demostrado actividad antioxidante en varias pruebas.¹⁴⁹ También algunos isotiocianatos por ejemplo isotiocianato de fenetilo presente en las verduras crucíferas, como el brócoli y el berro, han sido estudiadas ampliamente con el objetivo de evaluar sus propiedades quimiopreventivas y antioxidantes.¹⁵⁰ Ciertos compuestos órgano-azufrados como sulfuro de dialilo presente en el ajo también posee actividad antioxidante.¹⁵¹

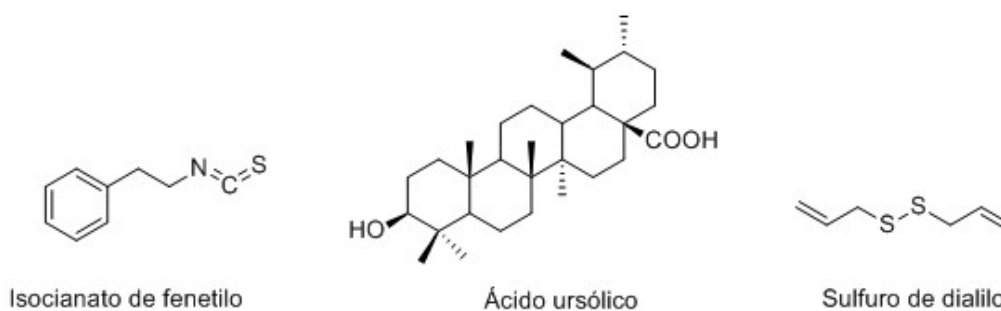


Figura 1.49. Otros tipos de antioxidantes.

El mecanismo de acción de los antioxidantes es variado pudiendo actuar de los siguientes modos, como captadores de radicales libres, inactivadores de peróxidos y otras ROS, “quenchers” de oxígeno singlete, quelantes de iones metálicos, inhibidores de productos secundarios de oxidación e inhibidores de enzimas pro-oxidativas, entre otros.¹⁵²

(147) Halliwell, B.; Rafter, J.; Jenner, A. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81* (1 Suppl), 268S – 276S.

(148) Lambert, J. D.; Elias, R. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *501* (1), 65–72.

(149) Montilla, M. P.; Agil, A.; Navarro, M. C.; Jiménez, M. I.; García-Granados, A.; Parra, A.; Cabo, M. M. *Planta Med.* **2003**, *69* (5), 472–474.

Así pues, en función de su modo de acción se puede hablar de; antioxidantes primarios los cuales rompen la reacción en cadena de oxidación mediante la eliminación de intermediarios de radicales libres y antioxidantes secundarios que previenen o retardan la oxidación por supresión del iniciador de oxidación o mediante la regeneración de antioxidantes primarios.

- Los antioxidantes primarios actúan por competición en reacciones de iniciación y propagación con los radicales libres, ROS o RNS. Cuando reaccionan con ellos, se da un cambio irreversible en su estructura, que por lo general transforma al antioxidante en un radical estable, y por tanto menos reactivo que los radicales iniciales.

- Los antioxidantes secundarios, también llamados sinérgicos, no poseen capacidad antioxidante por si solos. Estas especies retardan o previenen la oxidación al interactuar con un iniciador o acelerador; por ejemplo, sería el caso de agentes quelatantes de iones metálicos.¹⁵³

En las últimas dos décadas la investigación de nuevos antioxidantes ha ido creciendo de manera exponencial, creciendo el interés por el descubrimiento, aislamiento y síntesis de nuevas especies. La motivación principal viene de la versatilidad de acción que poseen en numerosos procesos redox y sus múltiples aplicaciones, que van desde su empleo en nuevos fármacos y tratamientos clínicos, hasta su uso en alimentos. Más concretamente en el ámbito alimenticio, los antioxidantes pueden ser usados bien como estabilizantes o bien por sus interesantes propiedades como parte de la composición de alimentos funcionales, suplementos dietéticos, alimentación animal y cosméticos, entre otros.¹⁵⁴

(150) Figueiredo, S.; Filho, S.; Nogueira-Machado, J.; Caligorne, R. *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.* **2013**, 7 (3), 213–225.

(151) Borek, C. *J. Nutr.* **2001**, 131 (3s), 1010S – 5S.

(152) Shahidi, F.; Zhong, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (11), 4067.

(153) Maset Castro, A. Síntesis de nuevos antioxidantes derivados del hidroxitirosol. Interacción con ciclodextrinas., **2014**.

(154) Augustyniak, A.; Bartosz, G.; Čipak, A.; Duburs, G.; Horáková, L.; Łuczaj, W.; Majekova, M.; Odysseos, A. D.; Rackova, L.; Skrzydlewska, E.; Stefek, M.; Štrosova, M.; Tirzitis, G.; Venskutonis, P. R.; Viskupicova, J.; Vranka, P. S.; Žarković, N. *Free Radic. Res.* **2010**, 44 (10), 1216–1262.

Ensayos de compuestos como Antioxidantes

Los términos “actividad antioxidante” y “capacidad antioxidante” tienen diferentes significados: la actividad antioxidante se refiere a la cinética de una reacción entre un antioxidante y el prooxidante o el radical que reduce, mientras que la capacidad antioxidante mide la eficiencia de conversión termodinámica en una sonda oxidante al reaccionar con un antioxidante. Se han desarrollado un gran número de ensayos y metodologías para medir la actividad y la capacidad antioxidante, pudiéndose clasificar en el tipo de reacción que los fundamenta:¹⁵⁵

- *Ensayos basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT, Hydrogen Atom Transfer)*. Estos miden la capacidad de un antioxidante para captar radicales libres mediante la donación de átomos hidrógeno.

- *Ensayos basados en la transferencia de un electrón (ET, Electron Transfer)*. En la mayoría de los ensayos basados en ET, se simula la acción antioxidante con una sonda de potencial redox específica.

Una clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT sería la siguiente:¹⁵⁶

Ensayo	Categoría
Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS)	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	
Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)	
N,N-dimetil-p- fenilendiamina (DMPD)	
Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	
Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP)	
Inhibición de la oxidación del ácido linoleico	
Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad	

(155) Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K. M.; Özyürek, M.; Güçlü, K. *Pure Appl. Chem* **2013**, 85 (5), 957–998.

(156) Tovar del Rio, J. Determinación de la actividad antioxidante por dpph y abts de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Tesis. **2013**.

Ensayo ABTS de la capacidad antirradicalaria

El ensayo ABTS es un método ampliamente utilizado, que permite medir la actividad de los antioxidantes por eliminación de radicales. Este ensayo espectrofotométrico, se fundamenta en la generación del catión radicalario ABTS^{•+} haciéndolo reaccionar con persulfato de potasio. Este radical catiónico es de color azul y absorbe luz a 734 nm. Siendo reactivo frente a la mayoría de los antioxidantes, cuando ABTS^{•+} es reducido por la acción del antioxidante vira nuevamente a su forma neutra incolora. La reactividad de los diversos antioxidantes probados se compara con la de Trolox, que es un análogo soluble en agua de vitamina E. Este ensayo se conoce a menudo como el ensayo de Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC).¹⁵⁷

El ensayo es aplicable tanto a antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos, incluyendo flavonoides, hidroxicinamatos, carotenoides y antioxidantes de plasma, también permite medir la actividad antioxidante total en disoluciones acuosas o lipofílicas.

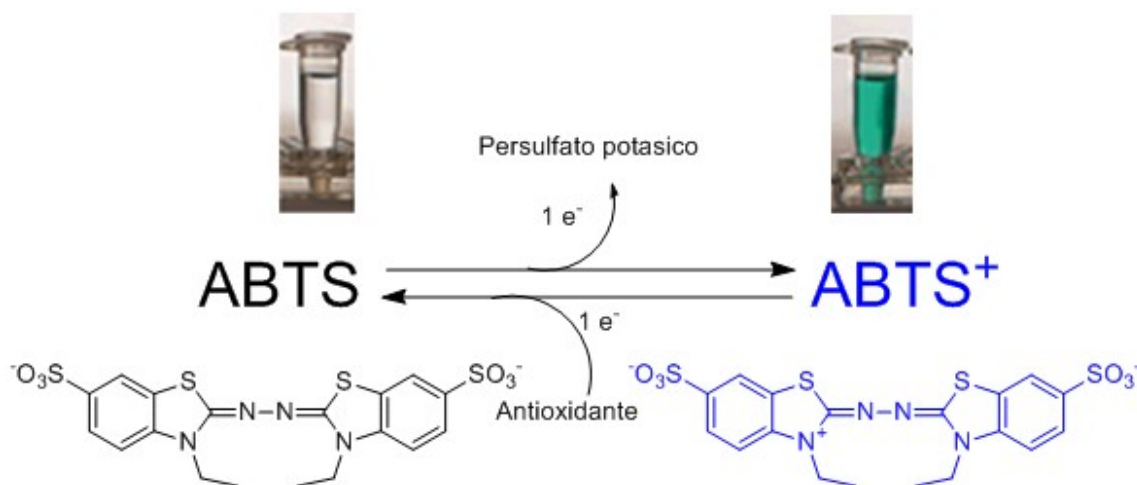


Figura 1.50. Ensayo ABTS.

(155) Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K. M.; Özyürek, M.; Güçlü, K. *Pure Appl. Chem* **2013**, *85* (5), 957–998.

(156) Tovar del Rio, J. Determinación de la actividad antioxidante por dpph y abts de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Tesis. **2013**.

(157) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26* (9-10), 1231–1237.

Método FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

En este método también se determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . El complejo férrico de 2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado.

Se trata por tanto de un método espectrofotométrico que ya se mide la absorbancia del complejo de Fe^{2+} . Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de Fe^{2+} y más alta el señal de absorbancia.

Debido a que el potencial redox del Fe^{3+} TPTZ es comparable con el del ABTS se pueden analizar compuestos similares con ambos métodos aunque las condiciones de la reacción sean distintas. El mecanismo del FRAP es únicamente de transferencia de electrones, sin la participación de radicales libres, según esto, el FRAP puede ser útil, en combinación con otros métodos, en la determinación de la capacidad antioxidante de productos que contengan una mezcla de distintos tipos de antioxidantes.¹⁵⁸

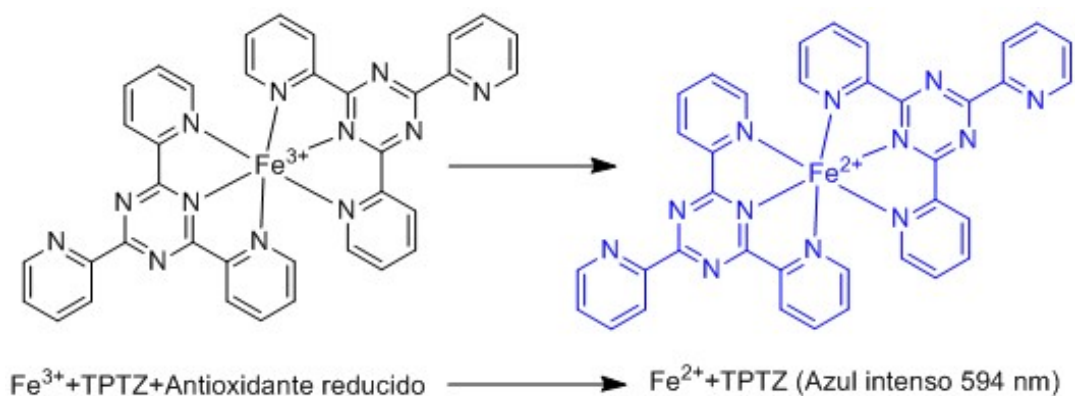


Figura 1.51. Ensayo FRAP.

(158) Medina, L. A. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos. 2012. Tesis doctoral.

1.11. ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA

Los países en desarrollo son especialmente susceptibles de sufrir epidemias de enfermedades infecciosas. Diferentes aspectos como la mala gestión de los desechos y el agua, el consumo de carne cruda o el deficiente control de plagas de insectos son factores responsables de millones de muertes anuales en las regiones rurales de los países del tercer mundo.¹⁵⁹ La OMS llamó Enfermedades Tropicales Desatendidas a aquellas que prevalecen en condiciones tropicales y subtropicales en 149 países, afectando a más de mil millones de personas y costando a las economías en desarrollo miles de millones de dólares cada año.

Como ya se ha visto anteriormente en este trabajo, muchos productos naturales poseen actividad biológica como agentes antiparasitarios, se comentó el caso de artemisinina, y sus derivados semisintéticos descubiertos por Tu Youyou. También ácido maslínico muestra actividad antipalúdica comportándose como un compuesto parasitostático plasmodial.¹⁶⁰

Una enfermedad parasitaria o parasitosis es un tipo de enfermedad infecciosa que puede ser causada bien por protozoos, gusanos o artrópodos. *Trypanosoma brucei* pertenece al grupo de protozoos, este parásito es la causa de la conocida como enfermedad del sueño transmitida por vectores a través de la mosca Tse-Tse. Hay 36 países en la región subsahariana de África que viven en riesgo de contraer esta enfermedad, lo que significa que alrededor de 60 millones de personas están bajo amenaza epidémica.¹⁶¹ Además, este parásito se transmite también en animales, produciendo una enfermedad conocida como Nagana; haciendo que el desarrollo en estas regiones se vuelva más difícil, debido a problemas que surgen con el ganado productivo o la actividad agrícola basada en animales domesticados.

Polifenoles como quercetina induce la apoptosis del *Trypanosoma brucei* y disminuye la respuesta proinflamatoria de los macrófagos humanos.^{162,163} También se ha reportado actividades tripanocidas y leishmanicidas de varios ésteres de ácidos grasos de tirosol e hidroxitirosol.¹⁶⁴ Lo que nos ha llevado a investigar y desarrollar una nueva serie de derivados de hidroxitirosol para testar su actividad.

(159) Hotez, P. J.; Alvarado, M.; Basáñez, M.-G.; Bolliger, I.; Bourne, R.; Boussinesq, M.; Brooker, S. J.; Brown, A. S.; Buckle, G.; Budke, C. M.; et al. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, 8 (7), e2865.

(160) Moneriz, C.; Marín-García, P.; García-Granados, A.; Bautista, J. M.; Diez, A.; Puyet, A. *Malar. J.* **2011**, 10 (1), 82.

(161) Jacobs, R. T.; Nare, B.; Phillips, M. A. *State. Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, 11 (10), 1255–1274.

(162) Mamani-Matsuda, M.; Rambert, J.; Malvy, D.; Lejoly-Boisseau, H.; Daulouède, S.; Thiolat, D.; Coves, S.; Courtois, P.; Vincendeau, P.; Mossalayi, M. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48 (3), 924–929.

(163) Tasdemir, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Yardley, V.; Schmidt, T. J.; Tosun, F.; Rüedi, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50 (4), 1352–1364.

(164) Belmonte-Reche, E.; Martínez-García, M.; Peñalver, P.; Gómez-Pérez, V.; Lucas, R.; Gamarro, F.; Pérez-Victoria, J. M.; Morales, J. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 119, 132–140.

Ensayos de citotoxicidad

El primer paso para comprobar si los productos tienen actividad biológica frente a parásitos es el estudio de su citotoxicidad. Esta prueba se realiza con el fin de detectar cuáles de los productos es capaz de producir efecto tóxico frente a la línea celular en estudio. Para el caso de la leishmaniasis la actividad se mide frente a promastigotes y también contra amastigotes que parasitan macrófagos.

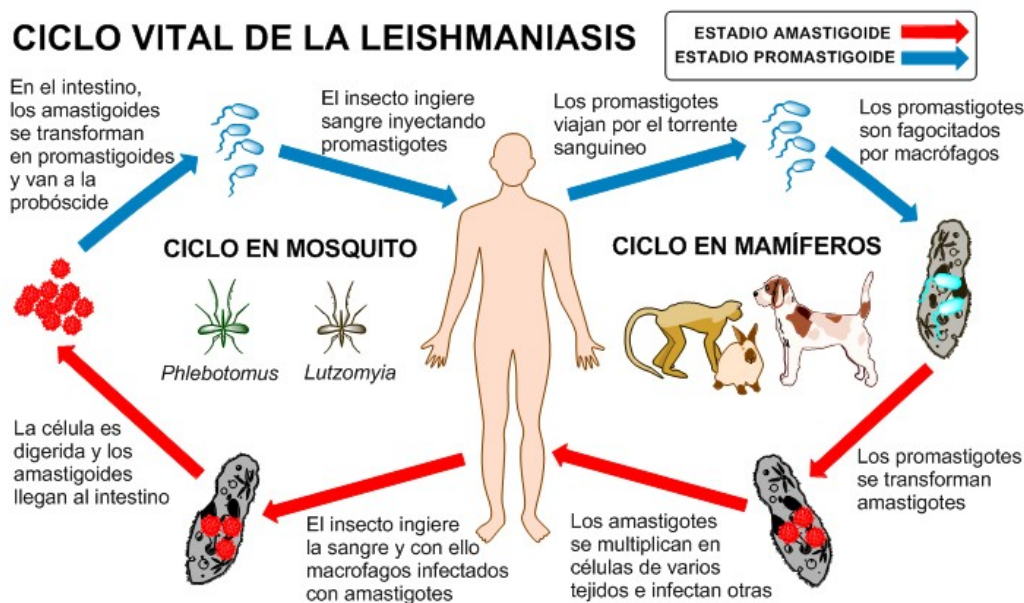


Figura 1.52. Esquema ciclo leishmaniasis.¹⁶⁵

Usualmente, las actividades antiparasitarias *in vitro* de cada compuesto son evaluadas contra la forma promastigoide y contra amastigotes axénicos, los cultivos axénicos consisten en una sola especie microbiana, proveniente de una sola célula. Aquellos compuestos que exhiben más del 40% de inhibición sobre amastigotes axénicos son posteriormente evaluados en amastigotes intracelulares. La citotoxicidad de estos compuestos también se evalúa frente a una línea celular humana no tumoral. Como control positivo se utilizan fármacos como Suramina un medicamento antihelmíntico, aún en el mercado, indicado para el tratamiento de la tripanosomiasis africana. Los índices de selectividad se calculan dividiendo el valor de la IC_{50} en la línea humana entre la IC_{50} parásito.¹⁶⁴ Como es lógico, cada ensayo se debe realizar mínimo por triplicado, con controles negativos (disolvente), controles positivos (Suramina de la cual se conoce su poder citotóxico) y células no tratadas.

(165) Hailu, A.; Mudawi Musa, A.; Royce, C.; Wasunna, M. *PLoS Med.* **2005**, 2 (7), 0590–0594.

Ensayo MTT

El ensayo MTT, es un método desarrollado por el Dr. Tim Mosmann en el DNAX Research Institute of Molecular and Cellular Biology de Estados Unidos en 1983.¹⁶⁶ El ensayo se realiza siguiendo los siguientes pasos, primero se hace el cultivo celular de todas las líneas, una vez sembradas, se incuban durante 24 h a 37°C y a un 5% de CO₂ para permitir su adherencia. Pasado este tiempo, se añade el producto a evaluar en un rango de concentraciones y se incuba de nuevo en las mismas condiciones, dejando al producto actuar durante un tiempo de al menos 24 h para asegurar su actividad, en caso que el producto solo actúe en algún momento del ciclo celular. Con tiempo suficiente para que el producto haya actuado se procede a realizar la tinción con MTT.

El MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) es una sal de tetrazolio, cuando se encuentra en el medio puede ser captado por las células vivas y reducido a un compuesto azul e insoluble llamado formazan. Esta reacción se da a través de la enzima succínico deshidrogenasa presente en las mitocondrias. La cantidad de compuesto reducido será por tanto proporcional a la cantidad de células vivas presentes. La concentración de formazan puede ser fácilmente medida por un espectrofotómetro, ya que el compuesto posee un máximo de absorbancia a 570 nm.

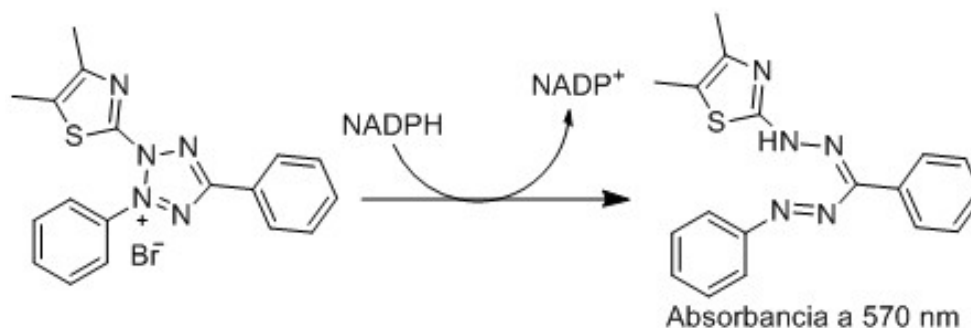


Figura 1.53. Reducción de MTT.

Cuando se añade el MTT se debe esperar al menos 4 h para que se pueda formar el formazan, este compuesto al ser apolar forma cristales en el medio, así que para una correcta medición de su concentración deben ser disueltos con isopropanol.

(166) Mosmann, T. J. *Immunol. Methods* **1983**, 65 (1-2), 55–63.

1.12. OBJETO DEL TRABAJO

Los compuestos bioactivos son componentes extra-nutricionales presentes en algunos alimentos que cuantitativamente sólo constituyen una pequeña parte de ellos. Varios compuestos bioactivos se utilizan como nutraceuticos, que pueden definirse como compuestos que tienen efectos beneficiosos para la salud, el tratamiento, o la prevención de ciertas enfermedades.

El trabajo de investigación que se expone en esta memoria se encuadra dentro del campo de los Productos Naturales en el área de Química Orgánica, por cuanto la materia prima utilizada procede de material de origen vegetal, por una parte desechos de la molturación de aceituna y por otro lado judías y brotes de la familia *Fabaceae* (*Papilionaceae* de la sistemática clásica). En los residuos de la molturación se encuentran entre otros los ácidos oleanólico y maslínico, los cuales han manifestado numerosas actividades biológicas, permitiendo algunas de ellas el desarrollo de patentes titularizadas por la Universidad de Granada. Entre ellas la utilización de estos ácidos para prevenir enfermedades causadas por parásitos del género *Cryptosporidium*, o como inhibidor de serín proteasas para el tratamiento de la enfermedad causada por el virus de inmunodeficiencia adquirida. También en dichos residuos se encuentran fenoles como tirosol e hidroxitirosol, los cuales proveen al aceite de oliva de sus propiedades antioxidantes propias. Estando demostrado que protege frente al daño oxidativo de especias reactivas de oxígeno (ROS), esto confiere al aceite efectos de protección cardiovascular demostrados en numerosos estudios epidemiológicos, relacionados con la dieta mediterránea.

Por otro lado, en este trabajo se han tratado judías y brotes procedentes de leguminosas como la *Mucuna pruriens* y la *Vicia faba*, las cuales contienen L-Dopa, un polifenol precursor de la dopamina utilizado como fármaco para la enfermedad de Parkinson.

A la vista del interés biológico de estos productos, un objetivo principal de este trabajo ha sido el aislamiento de todos estos productos naturales de su fuente natural, utilizando diversas técnicas de extracción, para su posterior cuantificación, ya que un estudio detallado de propiedades biológicas requiere de dichos metabolitos puros y conocer con exactitud la concentración de los mismos.

El primer artículo presentado, se ha realizado una minuciosa comparativa entre la extracción mediante microondas y Soxhlet de ácido maslínico y ácido oleanólico. Así se obtendrán dichos compuestos de interés biológico mediante procesos optimizados en tiempo, eficientemente y bajo condiciones altamente controladas, para un mayor aprovechamiento de los mismos y economizando un residuo contaminante.

En el segundo artículo, una vez adquirida destreza con la química de los polifenoles y en el tratamiento de muestras de origen vegetal, se ha extraído L-Dopa de distintas partes de leguminosas para su posterior cuantificación mediante resonancia magnética nuclear.

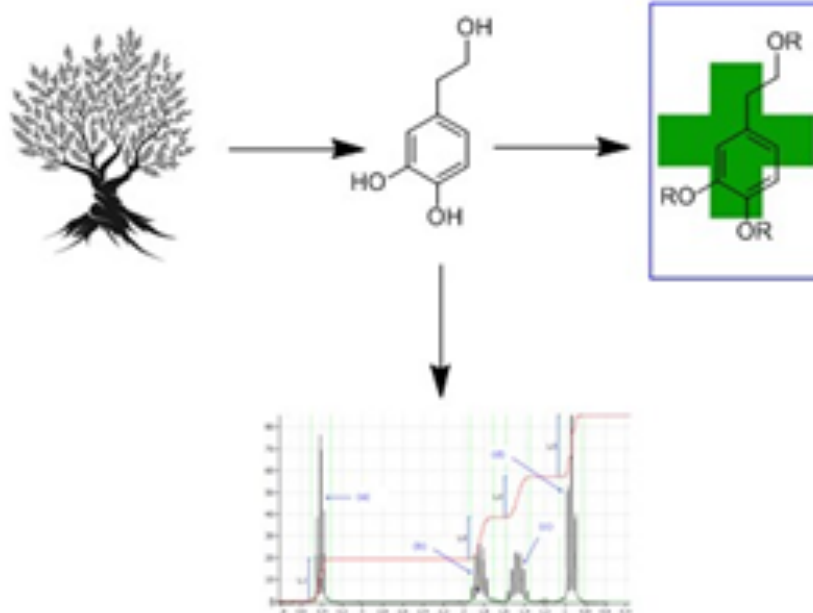
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La cuantificación mediante resonancia se ha centrado en conocer la concentración del aminoácido no proteico en los frutos y brotes de las leguminosas. Aunque no consta en el artículo definitivo también se ha realizado la derivatización química de L-Dopa presente en el fruto a fin de formar nuevos derivados que facilitan la extracción de L-Dopa pura.

El tercer artículo de esta memoria posee dos partes bien diferenciadas, por un lado, la extracción y purificación mediante la derivatización selectiva de tirosol e hidroxitirosol, utilizando reacciones químicas y enzimáticas modificando la polaridad de ambos productos. Por otro lado, se ha derivatizado hidroxitirosol para obtener productos apolares, uniéndole al polifenol una cadena alifática mediante un linker de carbonato, para el posterior estudio del poder antioxidante de cada uno de los nuevos derivados.

Por último, se presenta un artículo en el cual se han sintetizado utilizando la técnica de unión por linker de carbonato derivados de hidroxitirosol, unos de carácter dimérico y otros con una cadena alquílica que termina en un alcohol. Sobre estos productos y los derivados apolares del trabajo anterior se han realizado pruebas parasitológicas, a fin de medir su actividad tripanocida.

MATERIALES Y MÉTODOS



CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

En este capítulo se detallan los procedimientos experimentales o patentes que se usaron para obtener los distintos productos de partida, partiendo de alguna de sus fuentes naturales, puesto que este es uno de los objetivos clave se detallara para cada uno de los metabolitos de partida. También se describen los aparatos y técnicas con los que se obtuvieron los nuevos derivados. Finalmente, las distintas técnicas utilizadas para su caracterización tanto a nivel físico, químico o biológico.

El aislamiento de productos naturales a partir de su fuente tuvo como primera etapa la preparación del material de partida, puesto que, en todos los casos, la primera etapa fue una extracción sólido-líquido la muestra vegetal ha sido tratada tanto no molturada como molturada (con tamaño de partícula $< 250 \mu\text{m}$), para contrastar la importancia del contacto entre fases.

2.1. AISLAMIENTO DE LOS PRINCIPALES METABOLITOS

2.1.1. Obtención de los Ácidos Oleanólico y Maslínico

Los ácidos oleanólico y maslínico se aislaron partiendo de muestras secas de pieles de aceituna, que fueron obtenidos como residuos de la molturación de la aceituna, y que son generados como consecuencia de la fabricación de aceite de oliva. Para la extracción de la matriz se procedió siguiendo dos metodologías:

- Mediante extracción Soxhlet. El procedimiento que ha sido desarrollado por el Grupo de investigación “Biotransformaciones y Química de Productos Naturales”, encontrándose perfectamente detallado en sendas patentes nacional (P96061652) e internacional (W098/04331).
- Mediante extracción asistida por microondas. El procedimiento que ha sido desarrollado por nuestro Grupo de Investigación “*Biotransformaciones y Química de Productos Naturales*”, encontrándose perfectamente detallado en el artículo perteneciente a esta Memoria “Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction to determine triterpene acids in olive skins”

En función del disolvente empleado para la extracción, la proporción de ácido oleanólico frente a la de ácido maslínico varía considerablemente, pudiéndose encontrar una relación de 4:1 oleanólico-maslínico en los extractos de hexano, mientras que esta proporción es aproximadamente inversa en el extracto de acetato de etilo. Si se requiere purificar cada uno de los ácidos de la mezcla primero hay que concentrar estos extractos en rotavapor para obtener un residuo sólido con el cual se prepara una papilla con gel de sílice. Esta papilla se coloca en la cabeza de una columna cromatográfica que es eluida con mezclas crecientes de polaridad de hexano/acetato de etilo. Para seguir la evolución de la separación se utilizan placas de cromatografía con el fin de poder agrupar aquellas fracciones de composición similar. Para la identificación de estos se realizan medidas y se comparan con los datos bibliográficos de cada uno de los productos.

2.1.2. Obtención de L-Dopa.

Como ya se comentó en la introducción, levodopa puede ser aislada en cantidades apreciables partiendo de la molturación de diversas partes de leguminosas de la familia de las *Fabaceae*. Dependiendo de diversos factores como la pureza, la matriz o la finalidad con la que se obtenía la levodopa, se realizaron varios tipos de extracciones. Para la cuantificación por RMN del contenido en levodopa en distintas especies de leguminosas, el proceso de extracción se realizó utilizando agua clorhídrica 0.1 N. El sólido molturado fue tratado en ciclos de extracción varias veces, estos extractos posteriormente liofilizados fueron los que se emplearon para la cuantificación. Para la extracción mediante derivatización se usaron varias reacciones, las cuales dieron productos más apolares y solubles que la propia levodopa en disolventes orgánicos permitiendo su purificación mediante cromatografía en columna.

2.1.3. Obtención de Tirosol e Hidroxitirosol

Tanto como para la obtención de tirosol como de hidroxitirosol se partió de los mismos residuos de la producción de aceite de oliva, que fueron usados en el aislamiento de los ácidos oleanólico y maslínico. Ambos fenoles son aislados en forma de sirupo a partir de extracciones polares de los residuos. Este sirupo contiene una mezcla de proporciones variables de tirosol e hidroxitirosol así como de sus correspondientes derivados. Esta mezcla es extremadamente difícil de separar directamente en columna de silicagel, ya que su matriz es considerablemente densa y polar como para permitir una separación óptima. Para obtener ambos derivados puros se realizaron reacciones de derivatización sobre el sirupo con el fin de producir derivados apolares de los metabolitos deseados.

Se emplearon diversas metodologías que dieran lugar derivados apolares, siempre mediante reacciones fácilmente reversibles, para que una vez que fuesen aislados estos derivados pudieran ser de nuevo recuperados en su forma original. La mezcla de productos de reacción se coloca en la cabeza de una columna cromatográfica que es eludida con mezclas crecientes de polaridad, generalmente en diclorometano/acetona. Para seguir la evolución de la separación también se utilizan placas de cromatografía con el fin de poder agrupar aquellas fracciones de composición similar. Una vez aislados los derivados se puede proceder a la identificación para su identificación o se pueden emplear para reacciones posteriores. Si se requiere de hidroxitirosol y tirosol puros habrá que revertir la derivatización que hizo posible su separación.

2.2. INSTRUMENTACIÓN GENERAL BÁSICA

1) Para la realización de reacciones simultáneas se utilizó un Carousel 12 Plus Reaction Station de la casa Radleys, que permite reacciones a reflujo con temperatura controlada, refrigerado por agua corriente.

2) La liofilización de productos se realizó en un Freezemobile 12 L, de la casa Virtis, unido a un sistema de vacío.

3) Para la agitación orbital se utilizó un agitador con control de temperatura ambiental, Unimax 1010, de la casa Heidolph.

4) La evaporación de disolventes a vacío se realizó en un rotavapor Buchi Bath 210 con baño termostático unido a un sistema de vacío con resistencia química MZ 2C NT +AK+EK y refrigerado mediante chiller o recirculador de frío PolyScience.



Figura 2.1. Distintos instrumentos básicos: carrusel, liofilizador, agitador y rotavapor.

La extracción asistida por microondas se realizó en un Monowave EXTRA de la marca Anton Paar con reactor monomodo automatizado por operación secuencial desatendida de hasta 24 muestras y con un volumen de 30 mL.



Figura 2.2. Monowave EXTRA de Anton Paar.

2.3. TÉCNICAS GENERALES CROMATOGRÁFICAS

2.3.1. Cromatografía Flash a Media Presión

Se trata de una variación de cromatografía tradicional en columna, en la que el tamaño de las partículas del soporte es menor, generando más contrapresión sobre la fase móvil, esto obliga al uso de una fuente de presión para generar caudal de elución. Las cromatografías en columna se realizaron con gel de sílice como adsorbente (gel de sílice Scharlau 60, 40-60 μm) soportadas en columnas hechas de vidrio con diámetro variable en función de la masa de muestra a separar, trabajando con una presión de entre 0.8 y 1 atmósfera. Al trabajar con sílica se suele pasar la fase móvil en gradiente de polaridad creciente, empleando disolventes puros o mezclas, generalmente, CH_2Cl_2 -acetona, hexano-AcOEt, CHCl_3 -MeOH y se sigue la evolución de la columna mediante CCF.

2.3.2 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Para llevar a cabo la cromatografía se han usado placas con gel de sílice Merck 7747, cuyo espesor de vidrio es de 0.25 mm. Para pinchar los productos en las placas se usaron micropipetas Blaubrand intraMARK de 1 a 5 μl , para hacerlas visibles se utilizó bien la mezcla usualmente denominada “óleum” (H_2O - H_2SO_4 -AcOH, 4:1:20 ml) o bien una disolución etanólica de ácido fosfomolibdico al 7 % y calefacción a 150°C hasta aparición de manchas.

Además, ciertos derivados han sido visualizados mejor empleando una lámpara UV CAMAG después del revelado, que emite luz a longitudes de onda de 254 nm y 366 nm. Los disolventes usados como fase móvil eluyente han sido principalmente CH_2Cl_2 , acetato de etilo, acetona, hexano, cloroformo, metanol, isopropanol e incluso agua, bien solos o en mezclas, todo ello en función de la polaridad de los compuestos de interés a visualizar.

2.3.3. Cromatografía Líquida de Alta Presión Acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS)

Para los análisis por HPLC-MS se utilizó un sistema que consta de la instrumentación siguiente:

- Inyector-sistema de bombeo Waters 2795 Separations Mode Alliance HT.
- Detector UV-VIS de doble canal Waters 2487.
- Detector de masas con ionización en modelo electrospray modelo Waters Micromass ZQ.
- Ordenador de control del equipo con sistema operativo Windows 2000 professional y Masslynk™ 4.0. como software de control.

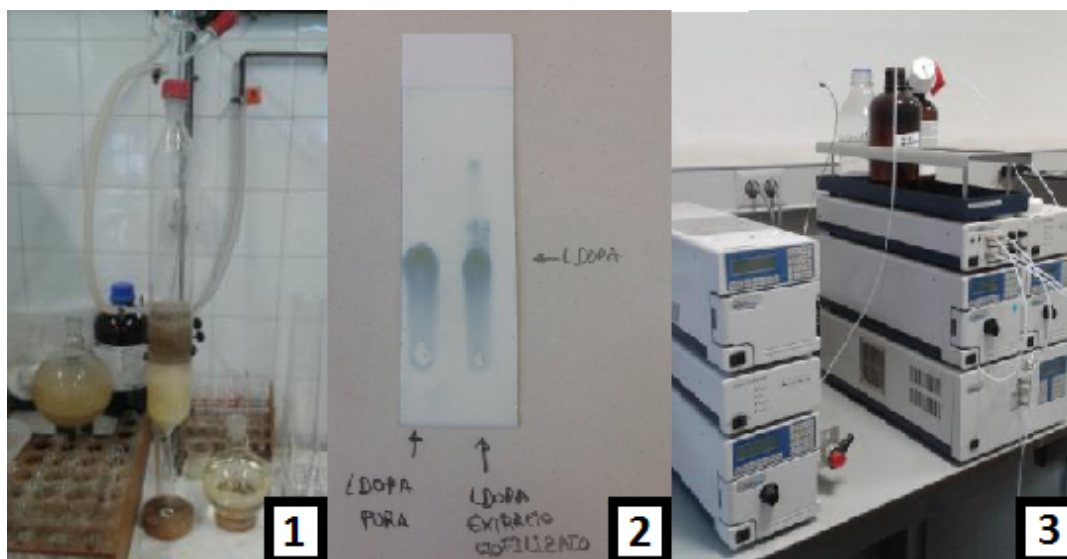


Figura 2.3. Distintas técnicas cromatográficas: columna (1), capa fina (2), HPLC (3).

2.4. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL

2.4.1. Espectrometría de Masas

Los espectros de masas se realizaron mediante Ionización a presión atmosférica por electrospray (ESI) el espectrómetro dispone de un sistema con analizador de tiempo de vuelo (TOF) WATERS modelo LCT Premier XE, con una jeringa de infusión para muestras disueltas y con UPLC Acquity Binary Solvent manager como cromatógrafo. El volumen de muestra fue de 2 mL CH₃CN/H₂O y se recurrió una columna en fase reversa Acquity UPLC BECH C18 130 Å 1.7 μm 2.1 mm x 50 mm. Los datos se expresan en unidades de masa (m/z).

2.4.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Para la obtención de los espectros de ^1H RMN y de ^{13}C RMN se utilizó un espectrómetro BRUKER AM-300 y BRUKER ARX-400, con cabeza dual, empleando como disolventes CDCl_3 o CD_3OD , los cuales suministran la señal del lock. Las asignaciones en ^{13}C RMN monodimensional se han realizado con la ayuda de experiencias DEPT (135°). Los espectros bidimensionales realizados con correlación $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HMBC y HMQC), se han realizado empleando programas de la casa Bruker, en las condiciones estándar del servicio de Resonancia Magnética Nuclear del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

2.4.3. Espectroscopía de Infrarrojo

La información de los espectros infrarrojos fue registrada en un espectrómetro MATTSON SATELLITE FTIR. Las frecuencias de los máximos de absorción están expresadas en cm^{-1} . Las muestras se utilizaron en forma de películas sobre cristales de NaCl .

2.4.4. Rotaciones Específicas ($[\alpha]_D$)

Las rotaciones específicas, $[\alpha]_D$, de las muestras se midieron disueltas en CHCl_3 o MeOH a la temperatura ambiente del laboratorio con dos polarímetros automáticos PERKIN-ELMER 141 y 341, empleando una célula de 1 dm de longitud.

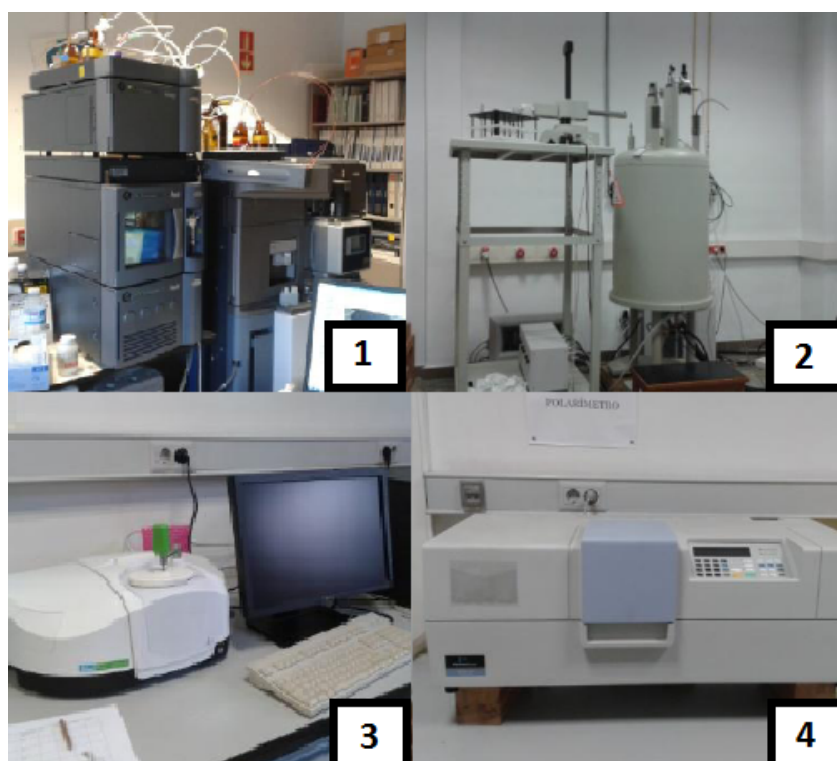


Figura 2.4. Distintos aparatos de determinación estructural: espectrómetro de masas (1), espectrómetro de RMN (2), espectrómetro de IR (3) y polarímetro (4).

2.5. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE SÍNTESIS EN DISOLUCIÓN

2.5.1. Método General de Acetilación Química

Se disuelven 0.2 mmol del producto a acetilar de partida en 5 mL de Ac₂O-Py (1:4) y se mantiene la reacción una hora a reflujo. Tras agitar durante 12 h a temperatura ambiente, se da por finalizada la reacción, se añade agua fría y se extrae varias veces con DCM. A continuación, se lava la fase orgánica con HCl y posteriormente con una disolución de NaHCO₃ hasta pH neutro, se seca en Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Por último, se purifica en columna flash de silicagel.

2.5.2. Método General de Acetilación Enzimática

Se disuelve 0.2 mmol del producto a acetilar de partida en 10 mL de una mezcla (1:1) de acetato de vinilo y acetato de etilo y se añade 1g de CAL. Se introducen en un agitador orbital termostatado a 140 rpm y una temperatura de 40 °C y se mantiene en agitación durante 48 h. Pasado este tiempo, se filtra la disolución y se evapora el disolvente a vacío. Por último, se purifica en columna flash de silicagel.

2.5.3. Método General de Laurificación Enzimática

Se disuelve 0.2 mmol del producto a esterificar de partida en 10 mL de una mezcla (1:1) de laureato de vinilo y acetato de etilo y se añade 1g de CAL. Se introducen en un agitador orbital termostatado a 140 rpm y una temperatura de 40° C y se mantiene en agitación durante 48 h. Pasado este tiempo, se filtra la disolución y se evapora el disolvente a vacío. Por último, se purifica en columna flash de sílica gel.

2.5.4. Método General de Saponificación

Se disuelve 0.2 mmol del producto esterificado de partida en 10 mL de una mezcla de THF–EtOH proporción (2:1). Se le añade una disolución KOH/MeOH 6M. La reacción se mantiene en agitación magnética durante 30 min a temperatura ambiente. Tras este proceso se añade gota a gota una disolución diluida de HCl en agua hasta alcanzar pH ligeramente ácido. La mezcla se extrae varias veces con DCM. Se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío, por último, se purifica en columna flash de sílica gel.

2.5.5. Método General de Bencilación

Se disuelve 0.2 mmol del producto de partida en 10 mL de acetona seca con 3 g de K₂CO₃ y se añaden 1,5 mL de BnCl. La reacción se deja en agitación durante 4 h a 55° C. Se añade agua fría y se extrae varias veces con DCM. La fase orgánica se seca en Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Por último, se purifica en columna flash de sílica gel.

2.5.6. Método General de Hidrogenación Catalítica

Se disuelven 0.2 mmol del producto bencilado de partida en 10 mL de DCM y se añade una punta de espátula de Pt activado sobre carbón. La disolución se introduce en un reactor para hidrogenar y se deja reaccionar con 4 atm de H₂ durante 24 horas. A continuación, se filtra, se concentra y se separa el bruto obtenido en la columna.

2.5.7. Método General de Metilcarbonatación

Se disuelve 0.2 mmol de producto de partida en 10 mL dimetilcarbonato y se añaden 2 mL de DBU. La reacción se tiene a reflujo con agitación durante 6-8 h. Se deja enfriar la mezcla y se evapora el disolvente a vacío. El residuo se disuelve en acetato de etilo y se lava con HCl 1N. La fase orgánica se seca en Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Por último, se purifica en columna flash de sílica gel.

2.5.8. Método General de Carbonatación de Dioles

Se disuelve 0.2 mmol del diol en 10 mL tolueno y se añade 1g de carbonildiimidazol. La reacción se tiene a reflujo con agitación durante 2 h. Pasado este tiempo, se enfría la disolución y se evapora el disolvente a vacío. Por último, se purifica en columna flash de sílica gel.

2.5.9. Método General de Acetonación de Dioles

Se disuelve 0.2 mmol del diol en 10 mL de acetona seca y se añaden 10 mL de 2,2-dimetoxipropano, a la mezcla se le añaden trazas de APTS. La reacción se tiene a reflujo y con agitación durante 3 h. Pasado este tiempo, se enfría la disolución y se evapora el disolvente a vacío. Por último, se purifica en columna flash de sílica gel.

2.5.10. Método General de Esterificación de un Ácido con un Alcohol

Se preparan 0.2 moles del alcohol en un baño hielo, una vez frío se añade gota a gota 0.5 mL de cloruro de tionilo, a la mezcla se le añade poco a poco el ácido a reaccionar. La reacción se tiene a temperatura ambiente y con agitación durante 18 h. Pasado este tiempo, se evapora el disolvente a vacío. El residuo se disuelve en DCM y se lava con una disolución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se seca en Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Por último, se purifica en columna flash de sílica gel.

2.5.11. Método General de Protección de una Amina con BOC

Se disuelve 0.2 mmol de la amina en 5 mL de dioxano y se añade 5 mL de una disolución acuosa de Na_2CO_3 al 10%. La disolución resultante se enfría a 0°C y se añade gota a gota 2,5 mL de una disolución de 1M de dicarbonato de ditercbutilo en dioxano. Pasada una hora la mezcla se deja a temperatura ambiente y con agitación durante 18 h. Pasado este tiempo, se evapora el disolvente orgánico a vacío y la capa acuosa se extrae tres veces con acetato de etilo. Los extractos orgánicos juntos se lavan primero con agua, después con una disolución acuosa de HCl al 5%, y por último con una disolución acuosa saturada de salmuera. La capa orgánica se sea sobre Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Por último, se purifica en columna flash de sílica gel.

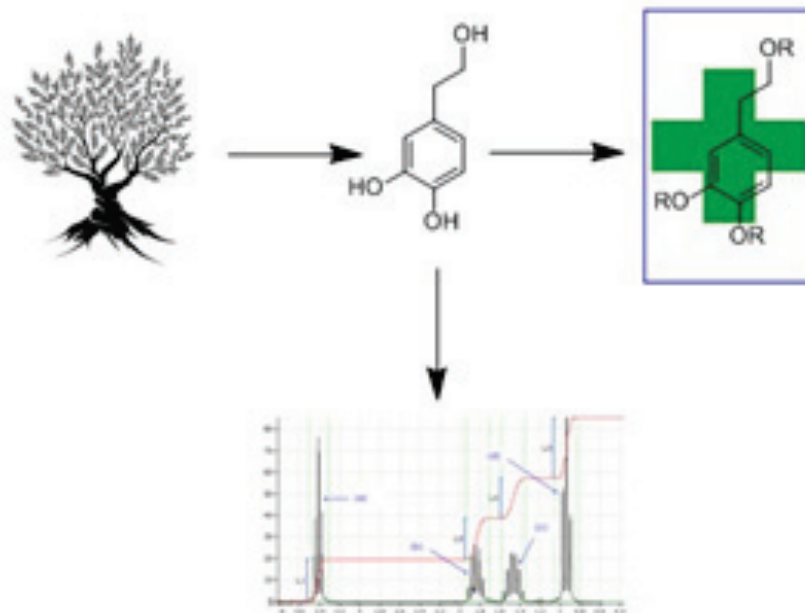
2.5.12. Método General de Formación de Cloroformiato sobre un Alcohol

Se disuelve 0.2 mmol del alcohol en 10 mL de THF a 0°C y en atmósfera de Ar, a la disolución se le añaden 240 μL triclorometilcloroformiato (Difosgeno) y 240 μL N,N-dimetilanilina lentamente. Tras 10 min agitando a 0°C se deja a temperatura ambiente 2 h. Transcurridas se adiciona Et_2O , se filtra y se lava con HCl 0.2M, NaOH 0.2M y H_2O . Se seca la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna flash de sílica gel.

2.5.13. Método General de Adición de un Alcohol al Cloroformiato

Se disuelven en 5 mL tolueno 310 μL de DIPEA, 80 mg de DMAP y 1.4 mmol del alcohol a unir. En atmósfera de Ar y a 0°C se adiciona 1 mmol del derivado con cloroformiato disuelto en 5 mL tolueno. Después de 15 min agitando a 0°C se deja a temperatura ambiente. Por último, se purifica en columna flash de sílica gel.

PUBLICACIONES



Publicación 1

Journal of Separation Science 2017, 40, 1209–1217.

JCR 2017: 2.415. Q2

Received: 3 October 2016 | Revised: 9 December 2016 | Accepted: 11 December 2016

DOI: 10.1002/jssc.201601130

RESEARCH ARTICLE



Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction to determine triterpene acids in olive skins

Ignacio Fernandez-Pastor¹ | Antonia Fernandez-Hernandez² | Sergio Perez-Criado¹ |
Francisco Rivas^{1*} | Antonio Martinez¹ | Andres Garcia-Granados¹ | Andres Parra¹

¹Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, Spain

²Centro "Venta del Llano" del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Agroalimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), Mengíbar, Jaén, Spain

Correspondence

Dr. Andres Parra, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Fuentenueva s/n, ES-18071 Granada, Spain.
Email: aparra@ugr.es

*Additional corresponding author:

Dr. Francisco Rivas
E-mail: frivas@ugr.es

Microwave-assisted extraction is compared with a more classical technique, Soxhlet extraction, to determine the content of triterpene acids in olive skins. The samples used in their original unmilled state and milled were extracted with ethyl acetate or methanol as solvents. The optimized operating conditions (e.g., amount and type of solvent, and time and temperature of extractions) to attain the better extraction yields have been established. For the identification and quantitation of the target compounds, an ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method was employed. The best results were achieved using the microwave-assisted extraction technique, which was much faster than the Soxhlet extraction method, and showed higher efficiency in the extraction of the triterpene acids (oleanolic and maslinic).

KEYWORDS

maslinic acid, microwave-assisted extraction, oleanolic acid, olive skin

1 | INTRODUCTION

The olive-oil industry produces huge amounts of liquid and solid wastes, posing a problem of environmental pollution, which is the greatest difficulty associated with this industry [1]. The current technique to extract olive oil, called "two-phase," requires no added water, and produces only one byproduct—as a combination of both liquid and solid wastes—called *alperujo* in Spanish (two-phase olive-mill waste), which has a high moisture content and contains skin, seed pulp, and olive pits [2]. When this byproduct is dried, two fractions are separated by blowing. The heavier fraction contains the olive pits and some olive seeds, usually used as solid fuel, and the lighter fraction is composed essentially of olive skins (*hollejo* in Spanish). These olive skins are the raw material used to isolate added-value compounds [3,4].

Extraction is the necessary first step in isolating and analyzing target components from natural raw materials. The extraction involves the use of selective solvents to separate active portions of plant or animal tissues from the inactive

or inert components. The most conventional extraction method is Soxhlet extraction (SE), whereby the solid material is placed in a cellulose thimble within an extraction chamber, which is situated on top of a collecting flask and under a reflux condenser [5–7]. This method has the advantage that the extraction is a continuous process, but has several disadvantages such as high consumption of solvent, long extraction time, and risk of thermal decomposition of the bioactive compounds. In recent years, the demand for new extraction techniques has been an increasing calling for automation with shorter extraction times and less consumption of organic solvent. In this sense, SFE is a new extraction method in which the organic solvents are replaced by supercritical fluids such as CO₂, considered safe for solvent-free extraction processes [8–10]. Pressurized solvent extraction or accelerated solvent extraction is a technique that uses a pressurized solvent at high temperatures to accelerate the extraction process by increasing the solubility of the different compounds in the solvent [11–15]. In the case of ultrasound-assisted solvent extraction, the extraction process uses ultrasound to break down the cell and thereby increase the solubilization of metabolites and improve extraction yields [16]. Finally, MAE is a method in which microwave heating is used in the extraction of compounds from many matrices. MAE is a technique of rapid sample preparation that allows extraction with reduced amounts of solvent in closed vessels

Abbreviations: MA, maslinic acid; MM, milled material sample; MRM, multiple reaction monitoring; OA, oleanolic acid; PDA, photodiode array detector; SE, Soxhlet extraction; SM, starting material sample

Conflict of interest: The authors declare no competing financial interest.

Microwave-assisted extraction vs. Soxhlet extraction to determine triterpene acids in olive skins

Ignacio Fernandez-Pastor,¹ Antonia Fernandez-Hernandez,² Sergio Perez-Criado,¹ Francisco Rivas,^{1*} Antonio Martinez,¹ Andres Garcia-Granados,¹ Andres Parra^{1*}

¹ Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Fuentenueva s/n, ES-18071 Granada, Spain

² Centro “Venta del Llano” del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Agroalimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), Mengíbar, Jaén, Spain

* Corresponding authors:

Tel.: +34 958 240480. Fax: +34 958 248437. E-mail: aparra@ugr.es (A. Parra)

Tel./Fax: +34 958 240479. E-mail: frivas@ugr.es (F. Rivas)

Abbreviations: **LSD**, least significant difference; **MA**, maslinic acid; **MM**, milled material sample; **MRM**, multiple reaction monitoring; **OA**, oleanolic acid; **PDA**, photodiode array detector; **SE**, Soxhlet extraction; **SM**, starting material sample; **TQD**, tandem quadrupole detector.

Keywords: Microwave-assisted extraction / Maslinic acid / Oleanolic acid / Olive skin.

Abstract

The comparison of the microwave-assisted extraction with a more classical technique, such as Soxhlet extraction, has been investigated to determine the content of triterpene acids in olive skins. The samples used in their original unmilled state and milled were extracted with ethyl acetate or methanol as solvents. The optimized operating conditions (e.g. amount and type of solvent, and time and temperature of extractions) to attain the better extraction yields have been established. For the identification and quantitation of the target compounds, an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry method was employed. The best results were achieved using the microwave-assisted extraction technique, which was much faster than the Soxhlet extraction method, and showed higher efficiency in the extraction of the triterpenic acids (oleanolic and maslinic).

3.1 Introduction

The olive-oil industry produces huge amounts of liquid and solid wastes, posing a problem of environmental pollution, which is the greatest difficulty associated with this industry [1]. The current technique extracting olive oil, called “two-phase”, requires no added water, and produces only one by-product –as a combination of both liquid and solid wastes– called *alperujo* in Spanish (two-phase olive-mill waste), which has a high moisture content and contains skin, seed pulp, and olive pits [2]. When this by-product is dried, two fractions are separated by blowing. The heavier fraction contains the olive pits and some olive seeds, usually used as solid fuel, and the lighter fraction is composed essentially of olive skins (*hollejo* in Spanish). These olive skins are the raw material used to isolate added-value compounds [3, 4].

Extraction is the necessary first step in isolating and analyzing target components from natural raw materials. The extraction involves the use of selective solvents to separate active portions of plant or animal tissues from the inactive or inert components. The most conventional extraction method is Soxhlet extraction (SE), whereby the solid material is placed in a cellulose thimble within an extraction chamber, which is situated on top of a collecting flask and under a reflux condenser [5–7]. This method has the advantage that the extraction is a continuous process, but has several disadvantages such as high consumption of solvent, long extraction time, and risk of thermal decomposition of the bioactive compounds. In recent years, the demand for new extraction techniques has been an increasing calling for automation with shorter extraction times and less consumption of organic solvent. In this sense, supercritical fluid extraction (SFE) is a new extraction method in which the organic solvents are replaced by supercritical fluids such as CO₂, considered safe for solvent-free extraction processes [8–10]. Pressurized solvent extraction (PSE) or accelerated solvent extraction (ASE) is a technique that uses a pressurized solvent at high temperatures to accelerate the extraction process by increasing the solubility of the different compounds in the solvent [11–15]. In the case of ultrasound-assisted solvent extraction (UASE), the extraction process uses ultrasound to break down the cell and thereby increase the solubilization of metabolites and improve extraction yields [16]. Finally, microwave-assisted extraction (MAE) is a method in which microwave heating is used in the extraction of compounds from many matrices. MAE is a technique of rapid sample preparation that allows extraction with reduced amounts of solvent in closed vessels with well-controlled high temperatures. This system allows multiple quantitative extractions of samples to be performed in minutes with high reproducibility while laboratory personnel undergo reduced exposure to solvents. MAE is also one of the best green technologies and has emerged as an efficient method for extracting several natural products, contaminants, additives, etc [17–23]. In recent years, MAE has been applied to the extraction of several types of compounds, such as phenolic products from alperujo [24], additives in polyolefins and polymers [25], diterpenes in green coffee oil [26], triterpenes and biophenols in olive leaves [27–30], polychlorinated biphenyls (PCBs) in foods and soils [31], and oleanolic acid in *Lantana camara* [32]. This method

has also been used for the extraction of whole plants, such as extraction of gallic acid in leaves of *Eucalyptus hybrid* [33], extraction of fatty acid derivatives from *Rhodotorula glutinis* [34], extraction of curcuminoids from *Curcuma longa* rhizome [35], and extraction of ginsenosides from recipes of traditional Chinese medicine [36].

Olive skins are remarkable by-products from the olive-oil industry and an important source of value-added compounds, such as oligosaccharides, mannitol, phenols, and triterpene acids. Notable among these products are pentacyclic triterpene compounds (oleanolic and maslinic acids) [37]. These natural pentacyclic triterpene compounds have revealed a wide variety of biological activities such as antiproliferative, antiinflammatory, anti-arthritic, antidiabetic, antiparasitic, antimicrobial, anti-viral, anti-cancer, and hepatoprotective agents [38–52].

In this paper we study the extraction of several compounds from the raw material olive skin, with different solvents in a monomode microwave reaction system. The aim is to optimize the operating conditions, including the amount and type of solvent, and the time and temperature of the extractions, in order to achieve better extraction yields. In addition, we have used another conventional extraction technique, i.e. Soxhlet extraction, to compare the effectiveness of the two extraction methods with respect to the total extract yielded and to the content in the triterpenoid compounds (oleanolic and maslinic acids).

3.2 Materials and methods

3.2.1 Standards and reagents

Standard oleanolic acid (OA) was purchased from Fluka (Steinheim, Germany). Standard maslinic acid (MA) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 18 β -Glycyrrhetic acid, from Extrasynthese, was used as an internal standard. Methanolic-stock standard solutions in the range of 0.05–1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were prepared for each analyte and stored at -20 °C. Standard solutions were analyzed by LC–MS daily. HPLC-grade ethyl acetate and methanol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Analytical-grade hexane, from Panreac (Barcelona, Spain), was used for the oil extraction in samples with the Soxhlet method. Deionized water, acetonitrile, and methanol of LC–MS grade, from Waters (Barcelona, Spain), were used for the preparation of chromatographic mobile phases. Formic acid, from Waters (Barcelona, Spain), was used as an additive in the mobile phases to enhance ionization required for MS detection.

3.2.2 Instrumentation

The unit of Soxhlet extraction used in this work, from JP Selecta S.A. (Barcelona, Spain), is equipped with six mantles and six Soxhlet devices. Microwave-assisted

extraction was performed in a Monowave EXTRA apparatus, an automated microwave reactor from ANTON PAAR (Graz, Austria).

3.2.3 Sample preparation

Samples of olive skins were obtained from the semi-solid by-products from two-phase olive-mill wastes. These samples were dried and used unmilled [starting material (SM) hereafter] or milled [milled material (MM) hereafter], to a particle size of < 250 μm .

3.2.4 Microwave-assisted extraction

3.2.4.1 Initial test

Using the device with MAE, several experiments were performed sequentially. In the first test, 20-mL reaction vials holding samples of 0.25, 0.50, and 1.00 g of the SM sample or the MM sample were placed in a Monowave EXTRA apparatus. The MAE experiments were made in triplicate for 10 min at 85 °C, adding 10 mL of EtOAc or MeOH as solvents. The ratios of sample mass (g):solvent volume (mL) were 1:40, 1:20, and 1:10, respectively. Afterwards, the extracts were filtered and the solvent evaporated under reduced pressure. Then, each residue was dried in a forced-air oven at 80 °C for 8 h. These extract-weight results are shown in Table S1.

Table S1. MAE initial test

Experiment	Ratio of sample mass (g):solvent volume (mL)		
	1:40	1:20	1:10
Mass extract (mg)			
A1	47.5	88.4	158.3
A2	51.7	99.9	184.2
A3	52.2	100.5	185.1
A4	56.6	108.2	212.3

A1: starting material (SM) extraction with EtOAc.

A2: milled material (MM) extraction with EtOAc.

A3: starting material (SM) extraction with MeOH.

A4: milled material (MM) extraction with MeOH.

3.2.4.2 Temperature influence

We analyzed the influence of the temperature on these MAE extractions, over a range of 80–100 °C, in 5 °C increments (Table S2). The other variables were fixed as follows: SM or MM sample mass = 0.5 g, $t = 10$ min, $V_{\text{solvent}} = 10$ mL. The ratio chosen of sample mass (g):solvent volume (mL) was 1:20. Each extract was separately filtered and concentrated under reduced pressure. Each residue was dried in a forced-air oven at 80 °C for 8 h.

Table S2. Mass extracts using the MAE technique at different temperatures^a

Extraction Temperature (°C)	Mass extract (mg)			
	EtOAc		MeOH	
	SM ^b sample	MM ^b sample	SM ^b sample	MM ^b sample
80	88.2	99.2	100.0	107.6
85	88.8	99.6	100.2	107.4
90	89.0	100.0	101.0	108.0
95	89.1	100.4	100.9	108.4
100	88.9	100.2	100.6	108.5

a) The ratio selected of sample mass (g)/solvent volume (mL) was 1/20.

b) SM sample (starting material sample), MM sample (milled material sample).

3.2.4.3 Time influence

We also tested the influence of the extraction time on the MAE extraction process, in a range of 2–20 min, taken every 2 min (Table S3). The other variables were fixed as follows: SM or MM sample mass = 0.5 g, T = 85 °C, V_{solvent} = 10 mL. Again, the ratio selected of sample mass (g):solvent volume (mL) was 1:20. Each liquid extract was separately filtered and concentrated under reduced pressure. Each residue was dried in a forced-air oven at 80 °C for 8 h.

Table S3. Mass extract using the MAE technique at different times^a

Extraction Time (min)	Mass extract (mg)			
	EtOAc		MeOH	
	SM ^b sample	MM ^b sample	SM ^b sample	MM ^b sample
2	88.2	98.2	99.4	107.2
4	88.3	98.6	99.2	107.6
6	88.2	99.4	99.8	108.4
8	88.4	99.6	100.8	109.0
10	89.0	100.0	100.4	107.9
12	90.4	100.4	101.0	108.4
14	90.2	100.6	100.6	107.9
16	90.0	101.2	101.2	108.6
18	89.6	100.8	100.8	108.8
20	88.8	101.0	100.9	109.0

a) The ratio selected of sample mass (g)/solvent volume (mL) was 1/20.

b) SM sample (starting material sample), MM sample (milled material sample).

3.2.4.4 Extraction curve

Finally, we performed nine MAE successive extractions on the same sample, with 10 mL of new solvent each time, to determine when the sample was depleted (Table 1). The conditions of the different extraction processes were $T = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 2\text{ min}$, on the SM and MM samples, with 0.25, 0.50, and 1.00 g of solid mass. The ratios of sample mass (g):solvent volume (mL) were 1:40, 1:20, and 1:10, respectively. Each value is the mean of triplicate measurements. The liquid portion of each extract was aspirated, from the respective vial, with a syringe having a built-in filter, and concentrated under reduced pressure. Then, each residue was dried in a forced-air oven at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 8 h.

Table 1. Microwave-assisted extraction curve

Extraction Time (min)	Ratio of sample mass (g):solvent volume (mL)					
	1:40		1:20		1:10	
	Mass extract (mg)					
	SM ^a sample	MM ^a sample	SM ^a sample	MM ^a sample	SM ^a sample	MM ^a sample
	EtOAc					
2	46.5	43.5	84.0	86.5	152.7	180.2
4	6.1	13.4	14.2	17.3	30.3	20.2
6	3.0	1.4	5.5	4.5	10.3	4.4
8	1.5	0.4	1.4	2.6	4.3	2.1
10	0.5	0.0	1.0	1.6	2.4	1.2
12	0.0	0.0	0.6	0.4	1.5	1.0
14	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.5
16	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.4
18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.3
Total mass	57.6	58.7	106.7	112.9	203.5	210.3
	MeOH					
2	46.0	46.9	88.4	94.5	175.7	180.3
4	11.2	12.6	19.1	18.0	28.6	20.5
6	1.9	1.5	2.5	3.2	5.6	10.7
8	0.7	1.1	1.4	1.2	3.6	5.2
10	0.3	0.3	0.8	0.8	1.8	3.0
12	0.0	0.0	0.3	0.2	1.0	1.5
14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.8
16	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.3
18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Total mass	60.1	62.4	112.5	117.9	216.9	222.3

a) SM sample (starting material sample), MM sample (milled material sample).

3.2.5 Soxhlet extraction

3.2.5.1 Initial test

Each sample was placed in cellulose-extraction thimbles and extracted in a Soxhlet apparatus, with EtOAc or MeOH as solvents, for 30 and 60 min, at 65–70 °C. The conditions of the different extraction processes were: 3.75, 7.50, and 15.0 g of the SM sample, in 150 mL of EtOAc or MeOH; or 2.0, 4.0, and 8.0 g of the MM sample, in 80 mL of EtOAc or MeOH. The ratios of sample mass (g):solvent volume (mL) were 1:40, 1:20, and 1:10, respectively. These liquid extracts were concentrated under reduced pressure. Then, each residue was dried in a forced-air oven at 80 °C for 8 h. These extract-weight results are shown in Table S4.

Table S4. SE initial test

Experiment	Ratio of sample mass (g):solvent volume (mL)					
	1:40		1:20		1:10	
	Mass extract (mg)					
	SM ^a sample	MM ^a sample	SM ^a sample	MM ^a sample	SM ^a sample	MM ^a sample
	EtOAc					
Extraction 30 min	39.6	42.5	82.7	82.5	164.7	171.8
Extraction 60 min	50.3	49.4	105.4	100.0	212.0	211.1
	MeOH					
Extraction 30 min	49.7	40.0	74.7	90.0	169.3	179.7
Extraction 60 min	55.6	51.9	104.2	108.1	211.1	208.4

a) SM sample (starting material sample), MM sample (milled material sample).

3.2.5.2 Extraction curve

We performed three SE successive extractions on the same sample, with new solvent each time, to determine when the sample was depleted (Table 2). The conditions of the three extraction processes were: T = 65–70 °C, t = 30 min, and 3.75, 7.50, and 15.0 g of the SM sample, with 150 mL of EtOAc or MeOH, or 2.0, 4.0, and 8.0 g of the MM sample, in 80 mL of EtOAc or MeOH. The ratios of sample mass (g):solvent volume (mL) were 1:40, 1:20, and 1:10, respectively. Each value is the mean of triplicate measurements. These liquid extracts were concentrated under reduced pressure. Then, each residue was dried in a forced-air oven at 80 °C for 8 h.

Table 2. Soxhlet extraction curve

Extraction Time (min)	Ratio of sample mass (g):solvent volume (mL)					
	1:40		1:20		1:10	
	Mass extract (mg)					
	SM ^a sample	MM ^a sample	SM ^a sample	MM ^a sample	SM ^a sample	MM ^a sample
	EtOAc					
30	39.6	42.5	82.7	82.5	164.7	171.8
60	10.7	6.9	22.7	17.5	47.3	39.5
90	5.4	3.8	5.4	6.9	5.9	5.1
Total mass	55.7	53.2	110.8	106.9	217.9	216.4
	MeOH					
30	49.7	40.0	74.7	90.0	169.3	179.7
60	5.9	11.9	29.5	18.1	41.6	28.7
90	0.9	2.5	2.5	2.5	2.2	5.9
Total mass	56.5	54.4	106.7	110.6	213.1	214.3

a) SM sample (starting material sample), MM sample (milled material sample).

3.2.6 Quantification of oleanolic and maslinic acids

3.2.6.1 UHPLC-MS/MS method

The ultra-high performance liquid chromatography system (UHPLC) was an AcQuity™ apparatus equipped with a binary pump system, using an AcQuity UHPLC™ BEH C18 column (100 mm x 2.1 mm, 1.7 μm), all from Waters (Milford, MA, USA). The mobile phase consisted of (A) acetonitrile and (B) water, containing 0.1% of formic acid, 75:25 (v/v), and kept isocratic for 10 min with a flow rate of 0.4 mL/min. During the analysis, the column was kept at 30 °C with an injection volume of 10 μL.

The UHPLC was coupled to a photodiode array detector (PDA) AcQuity™ and a tandem quadrupole detector (TQD) mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA). The software used was Masslynx 4.1. The wavelength in the PDA detector was set at 205–215 nm. For ionization, an electrospray (ESI) interface was used, operating in the negative mode, and the data were collected in the selected multiple reaction monitoring (MRM). The ionization source parameters were: capillary voltage 3kV, source temperature 150 °C, and desolvation gas temperature 350 °C with a flow rate of 650 L/h. Nitrogen (99.99% purity, N2 LC-MS nitrogen generator Zefiro 35, Strumenti Scientifici Cinel, Vigonza, Italy), and argon (> 99.99% purity, Air-Liquide, Madrid, Spain), were used as cone and collision gases, respectively. The MRM transitions and the individual cone voltage and collision energy for each triterpene compound were evaluated by

infusing 5 µg/mL, in order to establish the best instrumental conditions. Two MRM transitions were studied to find the most abundant product ions, selecting the most sensitive transition for quantitation, and a second one for confirmation purposes. For the positive identification of the analytes in the sample, the chromatographic retention time of each analyte should not vary more than 2%, compared to the standard; and the relative abundance of the two MRM transitions monitored had to be within 15% of the ratios calculated for the standards (Table S5).

Table S5. Optimized MRM conditions for the analyses of the studied triterpenic compounds by UHPLC-MS/MS

Compound	Precursor ion (m/z)	Quantitation (MRM ₁)			Confirmation (MRM ₂)		
		Product ion	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Product ion	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Oleanolic acid (OA)	455.54	407.65	90	40	389.71	90	45
Maslinic acid (MA)	471.48	393.36	80	40	405.21	80	50
18β-Glycyrrhetic acid	469.47	425.45	90	40	355.37	90	50

Standards oleanolic and maslinic acids were used to identify peaks. Methanolic-stock standard solutions in the range of 0.05 to 1.0 µg mL⁻¹ were prepared for each triterpenic acid to construct the calibration curve, and stored at -20 °C. Triterpene compounds were quantified using a TargetLynx system (Waters Inc.).

The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were determined by injecting a series of diluted solutions with known concentrations. LOD and LOQ were defined as the signal-to-noise ratio equal to 3 and 10, respectively. These results are shown in Table S6.

Table S6. Retention time. Regression equation. r^2 . reproducibility (RSD%). LODs and LOQs for the analysis of the triterpenic compounds by UHPLC-MS/MS in standard solutions

Compound	Retention time (min)	Regression equation	r^2 ^a	RSD ^b (%)	LOD ^c (mg/kg)	LOQ ^d (mg/kg)
Oleanolic acid (OA)	4.54	$y = 0.0003x - 1.1388$	0.9999	3.87	0.35	0.97
Maslinic acid (MA)	1.78	$y = 0.0002x - 3.7261$	0.9966	3.39	0.72	1.97
18β-Glycyrrhetic acid	2.10	$y = 0.00002x + 0.3189$	0.9966	7.96	0.001	0.002

a) Correlation coefficient

b) RSD (%) = (SD/mean)*100

c) Limit of detection (S/N = 3)

d) Limit of quantification (S/N = 10)

3.2.6.2 UHPLC-MS/MS analyses

The triterpenic acids (OA or MA) were quantified in olive-skin samples with a selected ratio of 1:20 [sample mass (g):solvent volume (mL)]. Two extractions were performed with the MAE technique (2 min each), and another two with the SE technique (30 min each), to achieve a high degree of depletion (> 95%) of these olive-skin samples, using EtOAc or MeOH as solvents. The experimental conditions were the same as those used in the corresponding extraction curves. The liquid extracts achieved were concentrated under reduced pressure, and then, each residue was dried in a forced-air oven at 80 °C for 8 h.

The analyses of the different resulting residues were performed as follows: each residue was dissolved in 2 mL of EtOAc or MeOH, and then filtered through a 0.45- μm pore size. This solution was diluted (1:20, v/v) in acetonitrile:water (75:25, v/v) (mobile phase). Finally, this solution was filtered through a 0.2- μm pore size, and an aliquot (100 μL in EtOAc or MeOH) together with 100 μL of a solution of 18 β -glycyrrhetic acid (7.5 mg/L), as an internal standard, were injected into the liquid chromatograph.

3.2.6.3 Statistical analysis

All data are presented as the means \pm standard deviation from the independent experiments made in triplicates. The data were evaluated by one-way ANOVA with the Statistix 8 program for Windows, and the differences between means were assessed using the Fisher LSD test. Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

3.3 Results

3.3.1 Microwave-assisted extraction

This experiment started with an initial test, under the conditions described above, and the results are shown in Table S1. The experiments performed were: A1 [starting material (SM) extraction with EtOAc], A2 [milled material (MM) extraction with EtOAc], A3 [starting material (SM) extraction with MeOH], and A4 [milled material (MM) extraction with MeOH]. The analysis of the weights of the extracts revealed that these increased from A1 to A4, for all the masses of each sample (0.25, 0.5, and 1.0 g), and therefore the best results were achieved when the extraction was performed with the MM sample using MeOH as solvent. Furthermore, these results indicate that when the mass of the different samples increased, the weight of the corresponding extract decreased slightly in proportion (Table S1).

The temperature influence on these MAE extraction experiments was analyzed with five SM samples and another five MM samples, with a ratio of sample mass (g):solvent volume (mL) of 1:20. These extractions were performed from 80 °C to 100 °C, in increments of 5 °C. In most cases, within this range, the temperature had almost

no influence on the extraction process, so that the extraction temperature chosen can be the lowest (Table S2).

The time influence on the MAE extractions was analyzed using 10 SM samples and another 10 MM samples, with a ratio of sample mass (g):solvent volume (mL) of 1:20. The experiments were performed increasing the extraction times from 2 to 20 min, in 2-min increments (Table S3). In general, we also observed that, in this period interval, the time had almost no influence on the extraction process, and thus the extraction time can be very short (2 min). Again, in both experiments, the best extraction results were achieved with the MM samples with MeOH as the solvent.

To draw the extraction curves of this experiment, we made 9 successive extractions per sample with clean solvent in each extraction (Table 1). These results showed that with the first extraction, the percentage of each extract was between 75–85% of the total weight, with the second extraction this percentage increased to 90–95%, and with the third extraction these values were higher than 95%. However, from the fourth extraction on, this percentage did not significantly increase. Furthermore, the total yields of the extraction were slightly higher when the experiments were performed with MeOH as the solvent, and the efficiency of the process was better when the sample mass was lower (0.25 or 0.50 g).

3.3.2 Soxhlet extraction

The Soxhlet extractions of the initial test were carried out on the SM and MM samples, with the same ratios of sample mass (g):solvent volume (mL) of the MAE experiments (1:40, 1:20, and 1:10), for 30 and 60 min, and using EtOAc or MeOH as solvents. The extract weights are shown in Table S4. These results show that with 60 min of extraction, the percentage of each extract was between 15–35% higher than with 30 min of extraction. However, the influence of particle size (SM or MM samples), the type of solvent, or the sample masses was not clear in this experiment.

The extraction curves with a Soxhlet apparatus were performed through three successive extractions (30 min each) on each sample, with clean solvent in each extraction (Table 2). These results showed that with the first 30 min of extraction, the percentage of each extract was between 75–85% of the total weight, and with the second extraction this percentage increased to 90–95%. Therefore, at least 60 min are necessary to recover around a 95% of the total weight of the extract. The other two variables of this experiment, temperature and time, were determined by the process itself.

3.3.3 Analyses of oleanolic and maslinic acid content by UHPLC-MS/MS

Table 3 presents the data quantifying the content (mg) of the triterpenic acids (OA or MA) relative to the mass of olive skin (g), of the SM and MM samples, using the two extraction techniques studied (MAE and SE). The triterpenic acids (OA or MA) were quantified in olive-skin samples with a selected ratio of 1:20 [sample mass (g):solvent

volume (mL)]. In general, OA was unexpectedly extracted more efficiently with the most polar solvent (MeOH), while MA was more successfully extracted by the less polar solvent (EtOAc).

Table 3. Quantification of OA and MA in olive-skin samples^a

Extraction Time (min)	Microwave (MAE)		Extraction Time (min)	Soxhlet (SE)	
	SM ^b sample	MM ^b sample		SM ^b sample	MM ^b sample
Oleanolic acid (mg/g olive skin)					
EtOAc					
2	8.10	7.81	30	6.50	4.75
4	2.92	2.16	60	1.65	1.61
Total mass ^c	11.02	9.97	Total mass ^c	8.15	6.36
MeOH					
2	11.53	9.44	30	6.55	5.49
4	0.82	2.33	60	1.21	1.89
Total mass ^c	12.35	11.77	Total mass ^c	7.76	7.38
Maslinic acid (mg/g olive skin)					
EtOAc					
2	14.42	15.22	30	10.74	11.79
4	9.35	7.34	60	6.40	3.71
Total mass ^c	23.77	22.56	Total mass ^c	17.14	15.50
MeOH					
2	13.71	13.51	30	11.79	11.45
4	4.16	5.21	60	3.71	2.61
Total mass ^c	17.87	18.72	Total mass ^c	15.50	14.06

a) The ratio selected of sample mass (g):solvent volume (mL) was 1:20.

b) SM sample (starting material sample), MM sample (milled material sample).

c) Total mass achieved with a high degree of depletion (>95%) of the olive-skin samples.

3.4 Discussion

The influence that the two extraction methods exerted on the total weight of the extracts and on the content of triterpenic acids (OA and MA) was analyzed.

3.4.1 Comparison of the total weight of the extracts

The two extraction techniques provided similar extraction yields, between 20–24% of the weight samples, with small variations depending of the type of sample and solvent

used (Table 4). The main differences between these two methods were the extraction time and ease of operating procedure of the corresponding technique.

Table 4. Total mass extracts (%) from olive-skin samples with MAE and SE processes

Process	Ratio of sample mass (g):solvent volume (mL)					
	1:40		1:20		1:10	
	Mass extract (%)					
	SM ^a sample	MM ^a sample	SM ^a sample	MM ^a sample	SM ^a sample	MM ^a sample
	EtOAc					
MAE	22.24	23.32	20.74	21.66	19.33	20.48
SE	20.12	19.76	21.08	20.00	21.20	21.13
	MeOH					
MAE	23.64	24.40	22.00	23.14	20.99	21.15
SE	22.24	20.76	20.84	21.62	21.09	20.84

a) SM sample (starting material sample), MM sample (milled material sample).

The time needed to achieve a high degree of depletion of the sample is an important factor when choosing an extraction method. The comparison of the two extraction processes (MAE and SE) revealed significant differences in this respect. While the MAE technique needed two or three extractions of 2 min each to achieve > 95% yield, the SE technique required 10-fold longer, with two extractions of 30 min each (Figure 1, Table S7). Furthermore, the MAE technique was the cleaner and easier method to operate.

Table S7. Mass extracts (mg) achieved with a high degree of depletion (>95%) of the olive-skin samples

Process	EtOAc		MeOH	
	SM sample	MM sample	SM sample	MM sample
MAE	103.7 Bbb ₂	108.3 Aba ₁	110.0 Aab ₂	115.7 Aaa ₁
SE	105.4 Aaa ₁	100.0 Bbb ₂	104.2 Bab ₂	108.1 Baa ₁

a) The ratio selected of sample mass (g):solvent volume (mL) was 1:20.

b) SM sample (starting material sample), MM sample (milled material sample).

c) Three extractions were performed with the MAE technique and two extractions with the SE technique.

d) Different capital letters indicate significant differences between the extraction process according to the Fisher LSD test at a $p < 0.05$ level of probability.

e) Different lowercase letters indicate significant differences between the solvent used into the extraction process according to the Fisher LSD test at a $p < 0.05$ level of probability.

f) Different underlined lowercase letters indicate significant differences between the sample preparation according to the Fisher LSD test at a $p < 0.05$ level of probability.

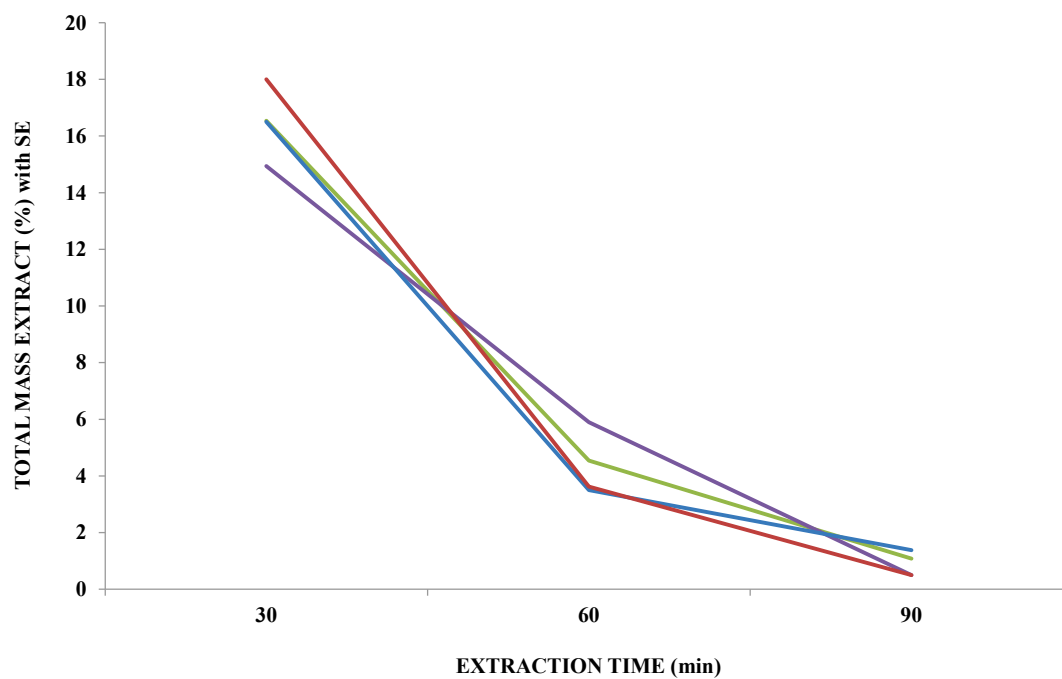
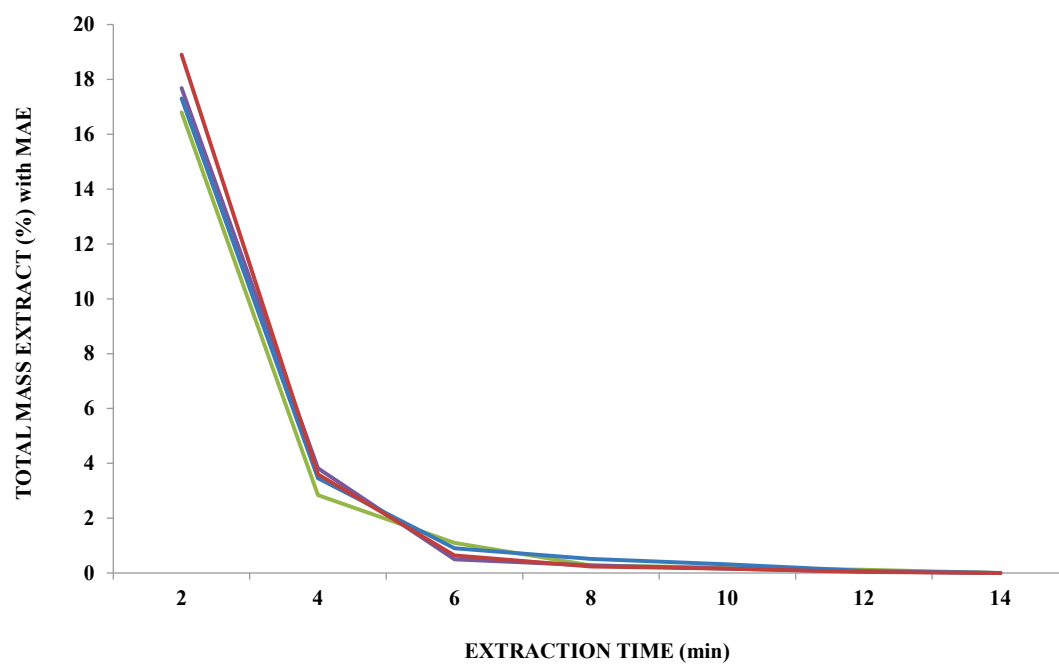


Figure 1. MAE-extraction curve vs. SE-extraction curve. Starting Material sample (SM) extracted with EtOAc (—). Starting Material sample (SM) extracted with MeOH (—). Milled Material sample (MM) extracted with EtOAc (—). Milled Material sample (MM) extracted with MeOH (—).

3.4.2 Comparison of the oleanolic acid and maslinic acid content

The proportion of triterpenic acids (OA/MA) was similar with both techniques, about 30/70, respectively, when using EtOAc as solvent, and about 35/65, respectively, when the solvent was MeOH. In general, SM samples gave surprisingly greater extraction yields (around 10–20%) in OA and MA than did the MM samples, regardless of the type of solvent used. The fact that the extraction results are quite similar in both types of samples is possibly due to the circumstance that the SM sample has a certain degree of milling. Therefore, it seems that a more homogeneous milling of the samples (MM) is not necessary to improve their extraction processes. Furthermore, the first extractions were more efficient for OA than for MA with both solvents (Table 3).

The MAE technique provided the best results for extracting these triterpenic acids, with yields around 40–60% higher for OA, and around 20–40% higher for MA, depending on the solvent and the type of sample used (Figure 2).

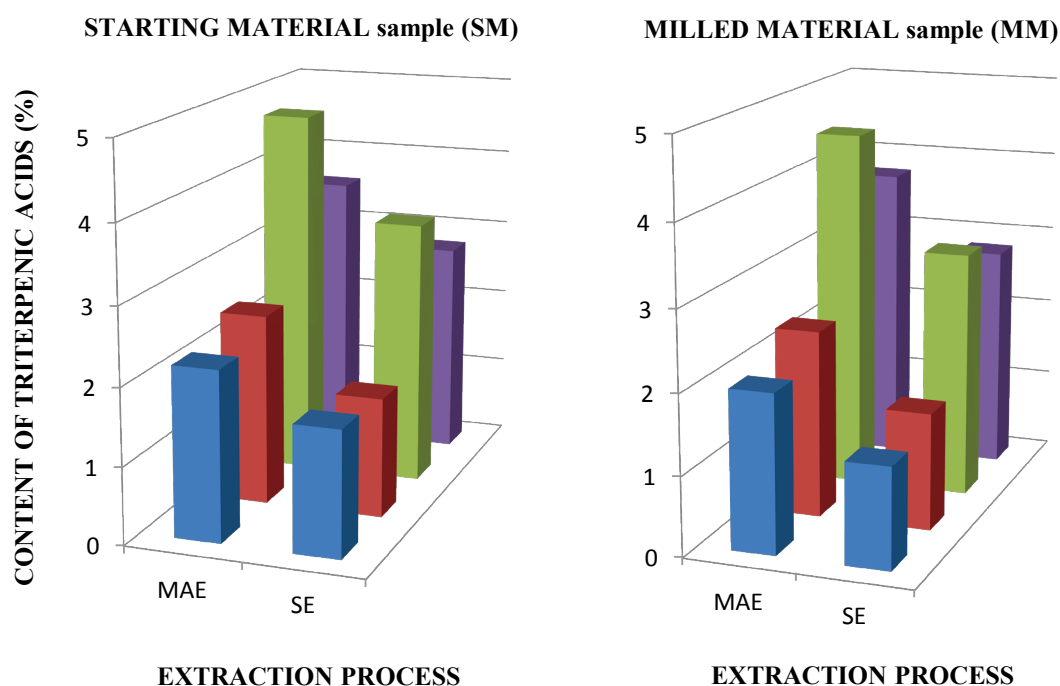


Figure 2. Content (%) of triterpenic acids (OA and MA) in olive-skin samples. OA extracted with EtOAc (■). OA extracted with MeOH (■). MA extracted with EtOAc (■). MA extracted with MeOH (■).

3.5 Concluding remarks

In summary, the advantages of the MAE technique were particularly evident in three key areas: a) MAE extraction is much faster than Soxhlet extraction (SE); b) The amount of organic solvent used is somewhat lower compared to the classic extraction (SE), especially when this process is performed on a larger scale; c) The efficiency in

the extraction of the triterpenic acids (OA and MA) is higher than with the conventional method (SE).

In conclusion, the MAE technique improves the extraction of triterpenic acids (OA and MA) present in olive skins, through a faster, cheaper, and more effective process. This extraction technique is considered an emerging method in Natural Products Chemistry, whereby the extraction processes are performed in a short time, efficiently, and under highly controlled conditions.

Acknowledgments

The authors would like to thank Anton Paar GmbH (Graz, Austria) for providing the microwave extraction device. A. Fernandez-Hernandez deeply appreciates the contract grant funded by the Agricultural Research Institute of Spain (INIA) and the European Social Fund. This work was also financially supported by a grant from the “Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa” of the “Junta de Andalucía” (P11-FQM-7372). We thank David Nesbitt for reviewing the English of the manuscript.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

3.6 References

- [1] Israilides, C., Scanlon, B., Smith, A., Harding, S. E., Jumel, K., Characterization of pullulans produced from agro-industrial wastes. *Carbohydr. Polym.* 1994, 25, 203–209.
- [2] Alburquerque, J. A., Gonzalvez, J., Garcia, D., Cegarra, J., Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technol.* 2004, 91, 195–200.
- [3] Fernandez-Bolaños, J., Rodriguez, G., Rodriguez, R., Guillen, R., Jimenez, A., Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste. *Grasas Aceites* 2006, 57, 95–106.
- [4] Fernandez-Bolaños, J., Rodriguez, G., Gomez, E., Guillen, R., Jimenez, A., Heredia, A., Rodriguez, R., Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: Isolation of added-value compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 5849–5855.
- [5] Luque de Castro, M. D., Priego-Capote, F., Soxhlet extraction: Past and present panacea. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 2383–2389.
- [6] Paarakh, P. M., Comparison of in vitro antioxidant activity of areca catechu linn nut by microwave extraction and soxhlation technique. *World J. Pharm & Pharm. Sci.* 2015, 4, 778–789.
- [7] Goulas, V., Manganaris, G. A., Towards an efficient protocol for the determination of triterpenic acids in olive fruit: A comparative study of drying and extraction methods. *Phytochem. Anal.* 2012, 23, 444–449.
- [8] De Melo, M. M. R., Silvestre, A. J. D., Silva, C. M., Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *J. Supercrit. Fluids* 2014, 92, 115–176.
- [9] Hurtado Benavides, A. H., Martin-Alvarez, P. J., Vazquez, L., Reglero, G., Señorans, F. J., Ibañez, E., Optimization of countercurrent supercritical fluid extraction of minor components from olive oil. *Curr. Anal. Chem.* 2014, 10, 78–85.
- [10] Xynos, N., Papaefstathiou, G., Psychis, M., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A. L., Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *J. Supercrit. Fluids* 2012, 67, 89–93.
- [11] Benavente, V., Fullana, A., Torrefaction of olive mill waste. *Biomass Bioenergy* 2015, 73, 186–194.

- [12] Buchmann, C. Felten, A., Peikert, B., Muñoz, K., Bandow, N., Dag, A., Schaumann, G. E., Development of phytotoxicity and composition of a soil treated with olive mill wastewater (OMW): An incubation study. *Plant Soil* 2015, 386, 99–112.
- [13] Havens, S. M., Hedman, C. J., Hemming, J. D. C., Mieritz, M. G., Shafer, M. M., Schauer, J. J., Comparison of accelerated solvent extraction, soxhlet and sonication techniques for the extraction of estrogens, androgens and progesterones from soils. *J. Agric. Chem. Environ.* 2014, 3, 103–120.
- [14] Suarez, M., Romero, M. P., Ramo, T., Macia, A., Motilva, M. J., Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 1463–1472.
- [15] Peres, V. F., Saffi, J., Melecchi, M. I. S., Abad, F. C., Jacques, R. A., Martinez, M. M., Oliveira, E. C., Caramao, E. B., Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. *J. Chromatogr. A* 2006, 1105, 115–118.
- [16] Priego-Capote, F., Ruiz-Jimenez, J., Luque de Castro, M. D., Fast separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis-diode array detection application to the characterisation of alperujo after ultrasound-assisted extraction. *J. Chromatogr. A* 2004, 1045, 239–246.
- [17] Egizabal, A., Zuloaga, O., Etxebarria, N., Fernandez, L. A., Madariaga, J. M., Comparison of microwave assisted extraction and soxhlet extraction for phenols in soil samples using experimental designs. *Analyst* 1998, 123, 1679–1684.
- [18] Jurado-Sanchez, B., Ballesteros, E., Gallego, M., Comparison of microwave assisted, ultrasonic assisted and soxhlet extractions of N-nitrosamines and aromatic amines in sewage sludge, soils and sediments. *Sci. Total Environ.* 2013, 463–464, 293–301.
- [19] Cicero, A. M., Pietrantonio, E., Romanelli, G., Di Muccio, A., Comparison of soxhlet, shaking, and microwave assisted extraction techniques for determination of PCB congeners in a marine sediment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2000, 65, 307–313.
- [20] Diagne, R. G., Foster, G. D., Khan, S. U., Comparison of soxhlet and microwave-assisted extractions for the determination of fenitrothion residues in beans. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3204–3207.
- [21] He, Y., Xiao, X., Cheng, Y., Li, G., Progress in field-assisted extraction and its application to solid sample analysis. *J. Sep. Sci.* 2016, 39, 177–187.

- [22] Waseem, R., Low, K. H., Advanced analytical techniques for the extraction and characterization of plant-derived essential oils by gas chromatography with mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2015, 38, 483–501.
- [23] Parera, J., Santos, F. J., Galceran, M. T., Microwave-assisted extraction versus soxhlet extraction for the analysis of short-chain chlorinated alkanes in sediments. *J. Chromatogr. A* 2004, 1046, 19–26.
- [24] Perez-Serradilla, J. A., Japon-Lujan, R., Luque de Castro, M. D., Simultaneous microwave-assisted solid-liquid extraction of polar and nonpolar compounds from alperujo. *Anal. Chim. Acta* 2007, 602, 82–88.
- [25] Sternbauer, L., Hintersteiner, I., Buchberger, W., Standler, A., Marosits, E., Evaluation of a microwave assisted extraction prior to high performance liquid chromatography for the determination of additives in polyolefins. *Polym. Test.* 2013, 32, 901–906.
- [26] Tsukui, A., Santos, H. M. Jr., Oigman, S. S., de Souza, R. O. M. A., Bizzo, H. R., Rezende, C. M., Microwave-assisted extraction of green coffee oil and quantification of diterpenes by HPLC. *Food Chem.* 2014, 164, 266–271.
- [27] Japon-Lujan, R., Luque-Rodriguez, J. M., Luque de Castro, M. D., Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J. Chromatogr. A* 2006, 1108, 76–82.
- [28] Romero, C., Garcia, A., Medina, E., Ruiz-Mendez, M. V., de Castro, A., Brenes, M., Triterpenic acids in table olives. *Food Chem.* 2010, 118, 670–674.
- [29] Sanchez-Avila, N., Priego-Capote, F., Ruiz-Jimenez, J., Luque de Castro, M. D., Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction. *Talanta* 2009, 78, 40–48.
- [30] Guinda, A., Rada, M., Delgado, T., Gutierrez-Adanez, P., Castellano, J. M., Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 9685–9691.
- [31] Bjoerklund, E., von Holst, C., Anklam, E., Fast extraction, clean-up and detection methods for the rapid analysis and screening of seven indicator PCBs in food matrices. *Trends Anal. Chem.* 2002, 21, 39–52.
- [32] Verma, S. C., Jain, C. L., Nigam, S., Padhi, M. M., Rapid extraction, isolation, and quantification of oleanolic acid from *Lantana camara* L. roots using microwave and HPLC–PDA techniques. *Acta Chromatogr.* 2013, 25, 181–199.
- [33] Verma, S. C., Nigam, S., Jain, C. L., Pant, P., Padhi, M. M., Microwave-assisted extraction of gallic acid in leaves of *Eucalyptus hybrida* maiden and its quantitative determination by HPTLC. *Chemica Sinica* 2011, 2, 268–277.

- [34] Chuck, C. J., Lou-Hing, D., Dean, R., Sargeant, L. A., Scott, R. J., Jenkins, R. W., Simultaneous microwave extraction and synthesis of fatty acid methyl ester from the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis*. *Energy* 2014, *69*, 446–454.
- [35] Dandekar, D. V., Gaikar, V. G., Microwave assisted extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*. *Separ. Sci. Technol.* 2002, *37*, 2669–2690.
- [36] Xu, H., Zhan, L., Zhang, Lin., Comparison of microwave-assisted and heat reflux extraction techniques for the extraction of ten major compounds from Zibu Piyin recipe using ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2016, *39*, 1009–1015.
- [37] Fernandez-Hernandez, A., Martinez, A., Rivas, F., Garcia-Mesa, J. A., Parra, A., Effect of the solvent and the sample preparation on the determination of triterpene compounds in two-phase olive-mill-waste samples. *J. Agric. Food Chem.* 2015, *63*, 4269–4275.
- [38] Medina-O'Donnell, M., Rivas, F., Reyes-Zurita, F. J., Martinez, A., Martin-Fonseca, S., Garcia-Granados, A., Ferrer-Martín, R. M., Lupiáñez, J. A., Parra, A., Semi-synthesis and antiproliferative evaluation of PEGylated pentacyclic triterpenes. *Eur. J. Med. Chem.* 2016, *118*, 64–78.
- [39] Fukumitsu, S., Villareal, M. O., Fujitsuka, T., Aida, K., Isoda, H., Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of pentacyclic triterpenoids maslinic acid through NF- κ B inactivation. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016, *60*, 399–409.
- [40] Bai, X., Zhang, Y., Jiang, H., Yang, P., Li, H., Zhang, Y., He, P., Effects of maslinic acid on the proliferation and apoptosis of A549 lung cancer cells. *Mol. Med. Rep.* 2016, *13*, 117–122.
- [41] Mukundwa, A., Mukaratirwa, S., Masola, B., Effects of oleanolic acid on the insulin signaling pathway in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic male Sprague-Dawley rats. *J. Diabetes* 2016, *8*, 98–108.
- [42] Melo, T. S., Gattass, C. R., Soares, D. C., Cunha, M. R., Ferreira, C., Tavares, M. T., Saraiva, E., Parise-Filho, R., Braden, H., Delorenzi, J. C., Oleanolic acid (OA) as an antileishmanial agent: Biological evaluation and in silico mechanistic insights. *Parasitol. Int.* 2016, *65*, 227–237.
- [43] Jesus, J. A., Lago, J. H. G., Laurenti, M. D., Yamamoto, E. S., Passero, L. F. D., Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: An update. *eCAM* 2015, 620472.
- [44] Yap, W. H., Lim, Y. M., Mechanistic perspectives of maslinic acid in targeting inflammation. *Biochem. Res. Int.* 2015, 279356.

- [45] Rodriguez-Rodriguez, R., Oleanolic acid and related triterpenoids from olives on vascular function: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Curr. Med. Chem.* 2015, 22, 1414–1425.
- [46] Parra, A., Martin-Fonseca, S., Rivas, F., Reyes-Zurita, F. J., Medina-O'Donnell, M., Rufino-Palomares, E. E., Martinez, A., Garcia-Granados, A., Lupiañez, J. A., Albericio, F., Solid-phase library synthesis of bi-functional derivatives of oleanolic and maslinic acids and their cytotoxicity on three cancer cell lines. *ACS Comb. Sci.* 2014, 16, 428–447.
- [47] Parra, A., Martin-Fonseca, S., Rivas, F., Reyes-Zurita, F. J., Medina-O'Donnell, M., Martinez, A., Garcia-Granados, A., Lupiañez, J. A., Albericio, F., Semi-synthesis of acylated triterpenes from olive-oil industry wastes for the development of anticancer and anti-HIV agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 74, 278–301.
- [48] Salvador, J. A. R., Leal, A. S., Alho, D. P. S., Goncalves, B. M. F., Valdeira, A. S., Mendes, V. I. S., Jing, Y., Highlights of pentacyclic triterpenoids in the cancer settings. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 2014, 41, 33–73.
- [49] Lozano-Mena, G., Sanchez-Gonzalez, M., Juan, M. E., Planas, J. M., Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives - a promising nutraceutical?. *Molecules* 2014, 19, 11538–11559.
- [50] Parikh, N. R., Mandal, A., Bhatia, D., Siveen, K. S., Sethi, G., Bishayee, A., Oleanane triterpenoids in the prevention and therapy of breast cancer: current evidence and future perspectives. *Phytochem. Rev.* 2014, 13, 793–810.
- [51] Sanchez-Quesada, C., Lopez-Biedma, A., Warleta, F., Campos, M., Beltran, G., Gaforio, J. J., Bioactive properties of the main triterpenes found in olives, virgin olive oil, and leaves of *Olea europaea*. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 12173–12182.
- [52] Castellano, J. M., Guinda, A., Delgado, T., Rada, M., Cayuela, J. A., Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes. *Diabetes* 2013, 62, 1791–1799.

Publicación 2

Phytochemical Analysis 2018, In Press.

JCR 2017: 2.337. Q2

Received: 8 June 2018 | Revised: 25 July 2018 | Accepted: 27 July 2018

DOI: 10.1002/pca.2793

RESEARCH ARTICLE

WILEY **Phytochemical
Analysis**Quantitative NMR analysis of L-Dopa in seeds from two varieties of *Mucuna pruriens*Ignacio Fernandez-Pastor¹ | Antonio Luque-Muñoz² | Francisco Rivas¹ |
Marta Medina-O'Donnell¹ | Antonio Martinez¹ | Rafael Gonzalez-Maldonado³ |
Ali Haidour² | Andres Parra¹ ¹Departamento de Química Orgánica,
Facultad de Ciencias, Universidad de Granada,
Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain²Unidad de Resonancia Magnética Nuclear,
Centro de Instrumentación Científica,
Universidad de Granada, Fuentenueva s/n, E-
18071 Granada, Spain³Neurologist. www.neuroconsulta.com,
Granada, Spain

Correspondence

Andres Parra and Francisco Rivas,
Departamento de Química Orgánica, Facultad
de Ciencias, Universidad de Granada,
Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain.
Email: aparra@ugr.es; frivas@ugr.es

Funding information

Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y
Empleo, Junta de Andalucía, Grant/Award
Number: P11-FQM-7372

Abstract

Introduction: L-Dopa, a key neurotransmitter used to treat neural disorders such as Parkinson's disease, is found in the seeds of the genus *Mucuna* at a sufficient concentration for possible commercial use.**Objective:** To develop a simple and reliable method to extract L-Dopa from *M. pruriens* seeds in an aqueous medium and then quantitate this compound using a ¹H qNMR method (internal standard); and also to evaluate the accuracy and reproducibility of this method with an NMR calibration curve.**Methodology:** The extraction method of L-Dopa from *M. pruriens* was optimized. The quantitation with single point quantitative NMR (qNMR) and NMR calibration curve was based on the resonance properties of the main functional groups of the L-Dopa molecule, in particular the signals of the three aromatic protons, which were compared with the signal of an internal standard such as syringic acid. The accuracy (precision and trueness) and reproducibility of both NMR techniques were evaluated.**Results:** The methods of single point qNMR and NMR calibration curve, applied to the seeds of two *M. pruriens* varieties, gave very similar L-Dopa contents: 3.0–3.2% and 3.0–3.1%, respectively.**Conclusion:** The statistical analysis confirmed the accuracy and reproducibility of this single point qNMR method (internal standard) for determining L-Dopa, as well as other commercial preparations of this species, without performing an NMR calibration curve.

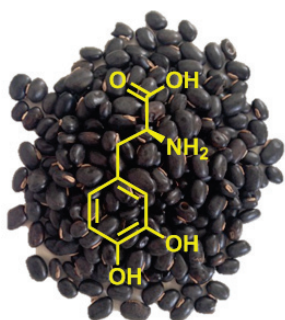
KEYWORDS

L-Dopa, *Mucuna pruriens*, qNMR, validation

1 | INTRODUCTION

L-Dopa [(–)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine], found in the seeds of 135 plant families, has been used to treat neuronal disorders such as Parkinson's disease. The only seed found to have enough L-Dopa for possible commercial use belongs to the genus *Mucuna* (Leguminosae).¹ *Mucuna pruriens*, a tropical legume of the family *Fabaceae* has a nutritional quality comparable to that of soybeans and other conventionallegumes, since it contains similar proportions of proteins, lipids, minerals, and other nutrients.^{2,3} This plant has a high enough content in L-Dopa to warrant possible commercial production. In fact, *M. pruriens* is among the plants used in Ayurveda, India's ancient medical system to fight disease, including Parkinson's.^{4,5}

The cause of Parkinson's is the depletion of dopamine. However, dopamine cannot be administered directly because it does not easily cross the blood-brain barrier. Therefore, its precursor L-Dopa is

Table of Contents Graphics

The L-Dopa content was determined in *Mucuna pruriens* seeds by means of a qNMR method, also optimizing the extraction process. The accuracy (precision and trueness) and the reproducibility of this NMR technique were evaluated. The results showed a content of L-Dopa in *Mucuna pruriens* seeds of approximately 3.0–3.2%, similar to the percentages published for other methods of quantitation of this compound.

Quantitative NMR analysis of L-Dopa in seeds from two varieties of *Mucuna pruriens*

Ignacio Fernandez-Pastor,^a Antonio Luque-Muñoz,^b Francisco Rivas,^{a*} Marta Medina-O'Donnell,^a Antonio Martinez,^a Rafael Gonzalez-Maldonado,^c Ali Haidour,^b Andres Parra^{a*}

^a Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

^b Unidad de Resonancia Magnética Nuclear, Centro de Instrumentación Científica, Universidad de Granada, Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

^c Neurologist. www.neuroconsulta.com. Granada. Spain

* Correspondence to:

Andres Parra, E-mail: aparra@ugr.es, Tel.: +34-958-240480, Fax: +34-958-248437.

Francisco Rivas: E-mail: frivas@ugr.es, Tel./Fax: +34-958-240479.

Keywords: L-Dopa, *Mucuna pruriens*, qNMR, validation

Funding information

This work was financially supported by a grant from the “Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa” of the “Junta de Andalucía” (P11-FQM-7372).

ABSTRACT

Introduction – L-Dopa, a key neurotransmitter used to treat neural disorders such as Parkinson's disease, is found in the seeds of the genus *Mucuna* at a sufficient concentration for possible commercial use.

Objective – To develop a simple and reliable method to extract L-Dopa from *Mucuna pruriens* seeds in an aqueous medium and then quantitate this compound using a ^1H qNMR method (internal standard); and also to evaluate the accuracy and reproducibility of this method with an NMR calibration curve.

Methodology – The extraction method of L-Dopa from *Mucuna pruriens* was optimized. The quantitation with single point qNMR and NMR calibration curve was based on the resonance properties of the main functional groups of the L-Dopa molecule, in particular the signals of the three aromatic protons, which were compared with the signal of an internal standard such as syringic acid. The accuracy (precision and trueness) and reproducibility of both NMR techniques were evaluated.

Results – The methods of single point qNMR and NMR calibration curve, applied to the seeds of two *Mucuna pruriens* varieties, gave very similar L-Dopa contents: 3.0–3.2% and 3.0–3.1%, respectively.

Conclusion – The statistical analysis confirmed the accuracy and reproducibility of this single point qNMR method (internal standard) for determining L-Dopa, as well as other commercial preparations of this species, without performing an NMR calibration curve.

4.1 INTRODUCTION

L-Dopa [(–)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine], found in the seeds of 135 plant families, has been used to treat neuronal disorders such as Parkinson's disease. The only seed found to have enough L-Dopa for possible commercial use belongs to the genus *Mucuna* (Leguminosae).¹ *Mucuna pruriens*, a tropical legume of the family *Fabaceae* has a nutritional quality comparable to that of soybeans and other conventional legumes, since it contains similar proportions of proteins, lipids, minerals, and other nutrients.^{2,3} This plant has a high enough content in L-Dopa to warrant possible commercial production. In fact, *M. pruriens* is among the plants used in Ayurveda, India's ancient medical system to fight disease, including Parkinson's.^{4,5}

The cause of Parkinson's is the depletion of dopamine. However, dopamine cannot be administered directly because it does not easily cross the blood-brain barrier. Therefore, its precursor L-Dopa is administered orally and is readily absorbed through the intestine and converted into dopamine by decarboxylase. Therefore, L-Dopa can relax the symptoms of Parkinson's disease.^{6,7} In nutraceutical studies using animal models with Parkinson's disease, *M. pruriens* cotyledon powder has registered antiparkinsonian and neuroprotective effects that surpass those of synthetic L-Dopa.⁸

Several methods have been described in the literature for the quantitative determination of L-Dopa in various biological samples and pharmaceutical preparations, such as spectrofluorometry, gas chromatography, high-performance liquid chromatography (HPLC), high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) chemiluminescence, and electrochemical determination.⁹⁻¹⁵ In comparison with these techniques, NMR spectroscopy in quantitative analysis has the advantage that the determination can be made by adding an internal standard without performing a calibration curve. This is because, when a qNMR method is used, the area of each signal is proportional to the molar concentration of the compounds analyzed.¹⁶⁻¹⁸ NMR spectroscopy has been used to confirm the identity and quantity of L-Dopa, carbidopa, and methyldopa in human serum and pharmaceutical preparations.¹⁹

The aim of the present study is to develop a simple and reliable method of aqueous extraction of L-Dopa from *M. pruriens* seeds and to determine the concentration of L-Dopa in this aqueous extract by ¹H NMR using a qNMR method (internal standard), and also to evaluate the accuracy and reproducibility of this method with an NMR calibration curve.

4.2 EXPERIMENTAL

4.2.1 Plant material

The seeds of *Mucuna pruriens preta* (MPP) were acquired from Juruti, Pará (Brazil), and the seeds of *M. pruriens kaunch* (MPK) were obtained from Vinukonda, Andhra Pradesh (India). The seeds of *Vicia faba Aguadulce* (VFA) were acquired from “Semillas Batlle S.A.” (Barcelona, Spain). These seeds were authenticated by Dr. J. L. Rosúa, Departamento de Botánica, Universidad de Granada, Spain. Vouchers were kept in our laboratory for further reference. Samples of these seeds were also deposited and cultivated in the plant nursery “Semillero FeryBel S.L.” (Pulpí, Almeria, Spain), in October and November 2016.

4.2.2 Reagents and solutions

L-Dopa (levodopa, (–)-3-(3,4-dihydroxylphenyl)-L-alanine, (S)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid, CAS 59-92-7) and syringic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid, CAS 530-57-4) were purchased from Acros Organics (Steinheim, Germany). The syringic acid was used as an internal standard. Deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-d₆, CAS 2206-27-1) and deuterated water (D₂O, deuterium oxide, CAS 7789-20-0) were purchased from Euriso-Top (Saint-Aubin, France). Milli-Q water (18.2 MΩ cm) was obtained from a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). Hydrochloric acid 0.1 M (HCl) was purchased from Fisher Scientific (Madrid, Spain). Zandopa®, an herbal remedy of *M. pruriens* extracts, was purchased from Zandu Realty Limited (Mumbai, India).

From these reagents, two standard solutions were prepared:

- Solution of L-Dopa: 5000 µg/mL in a solution 0.1 M HCl·H₂O:D₂O (9:1).
- Solution of syringic acid: 5000 µg/mL in DMSO-d₆.

Ten calibration solutions of L-Dopa at concentrations of 4500, 3500, 2500, 1500, 1200, 900, 600, 300, 90, and 45 µg/mL were prepared from the L-Dopa and syringic acid solutions to draw the calibration curve. The concentration of the internal standard solution (syringic acid) was 500 µg/mL, at all points of the calibration curve. All these solutions were completed using a solution 0.1 M HCl·H₂O:D₂O (9:1).

4.2.3 Instrumentation and software

A 600 MHz Varian Direct Drive NMR spectrometer (Agilent Technologies, CA, USA) equipped with an indirect XYZ gradient detection probe ^1H (^{13}C , ^{15}N) was used to measure samples and standard solutions. A round-bottom flask, stove, and reflux cooling system were used for the extraction of the samples. The final extract was dried in a Telstar Cryodos lyophilizer (Azbil Telstar). An ultrasonic bath Branson 52510 (EMERSON Technologies GmbH, Dietzenbach, Germany) and a Nahita Mini Centrifuge 2507/7 were used to prepare the lyophilized extract.

MNova v.9.0 NMR software equipped with qNMR v.1.2.0 plug-in (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, Spain) was used to treat the ^1H NMR spectra, while Statgraphics Centurion XVI v.16.2 (Statpoint Technologies Inc., VA, USA) and Microsoft[®] Excel 2013 v.15.0 (Microsoft, WA, USA) served for the statistical treatment of the data.

4.2.4 Extraction procedure of L-Dopa in *Mucuna pruriens*

Ten grams of seeds of *Mucuna pruriens* (MPP or MPK) were ground and added to 20 mL of a 0.1 M solution of HCl in a round-bottom flask and heated at reflux for 3 h. The same procedure was used with 10 g of commercial Zandopa. Then, each mixture was centrifuged at 4000 rpm for 4 min and the supernatant was collected. Thereafter, each supernatant was diluted to 50 mL with the HCl solution, and an aliquot volume (V_a , mL) was transferred to an Eppendorf tube and lyophilized. Each lyophilized extract was redissolved by adding 0.63 mL of the 0.1 M HCl-H₂O:D₂O solution (9:1) and 0.07 mL of the standard syringic acid solution, sonicated for 10 min, and centrifuged at 7000 rpm for 5 min. Finally, each supernatant was transferred to a NMR tube for further measurement.

The number of extraction cycles required was also evaluated. Thus, six samples (10 g per sample) of each type of seed were extracted as described above. Samples 3 and 4 were extracted twice whereas samples 5 and 6 were extracted three times. For each sample, the 50 mL of solution obtained in each extraction cycle were added. Finally, the aliquot volume (V_a) was 0.2, 0.4 or 0.6 mL for samples with one, two or three extraction cycles, respectively. These aliquots were treated as indicated above.

4.2.5 Preparation of spiked *Vicia faba Aquadulce* extracts

This procedure was used only to evaluate the accuracy of the qNMR method. A total of 10 g of *Vicia faba Aquadulce* seeds (a species of the *Fabaceae* family which contains small amounts of L-Dopa) were extracted and analyzed by the procedure described in Section 2.4. In an aliquot of 1.5 mL of this extract, the concentration of L-Dopa was between the limits of detection and quantitation (Figure S1), and therefore aliquots of

smaller volume (0.5 mL) were used as blank extracts to evaluate the accuracy of the qNMR technique, due to the absence of certified materials. Therefore, these blank extracts (0.5 mL each) were spiked at three different concentrations by adding the calibration solutions (4500 $\mu\text{g/mL}$, 1200 $\mu\text{g/mL}$, and 90 $\mu\text{g/mL}$). Each spiked aliquot was lyophilized and analyzed in the same way as with the lyophilized extracts of *M. pruriens*.

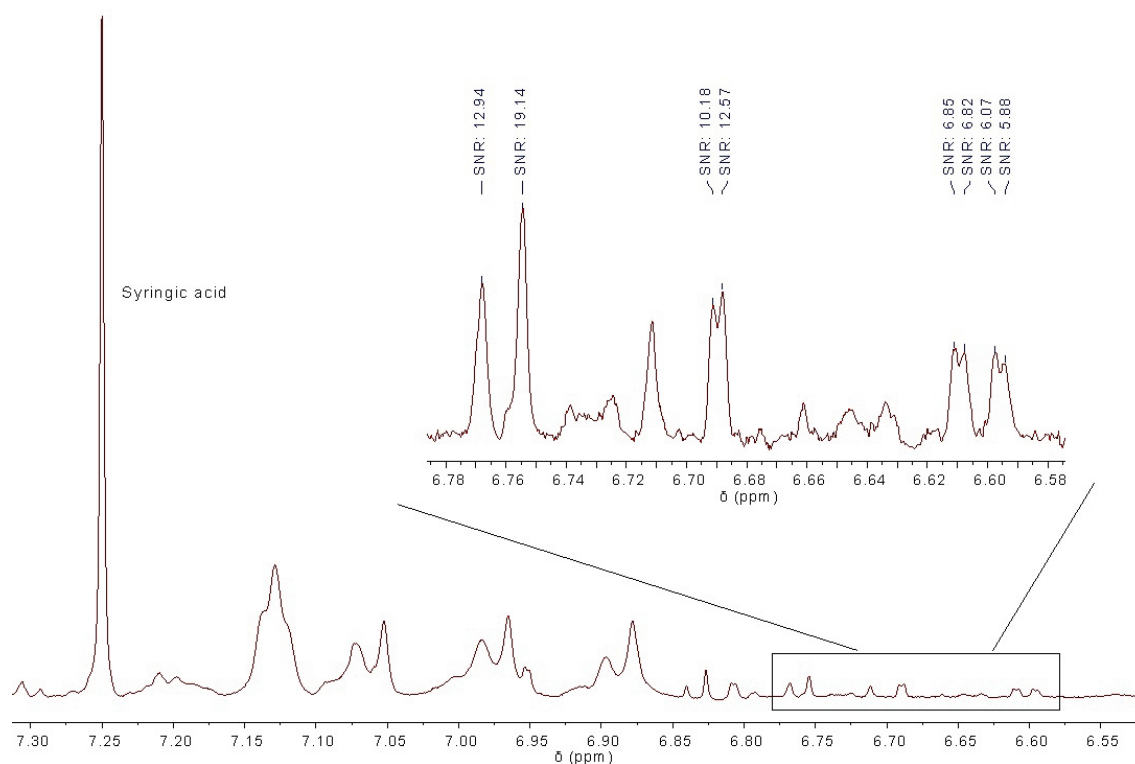


Figure S1. ^1H NMR spectrum of the aromatic area of VFA seed extract with syringic acid

4.2.6 NMR Analysis

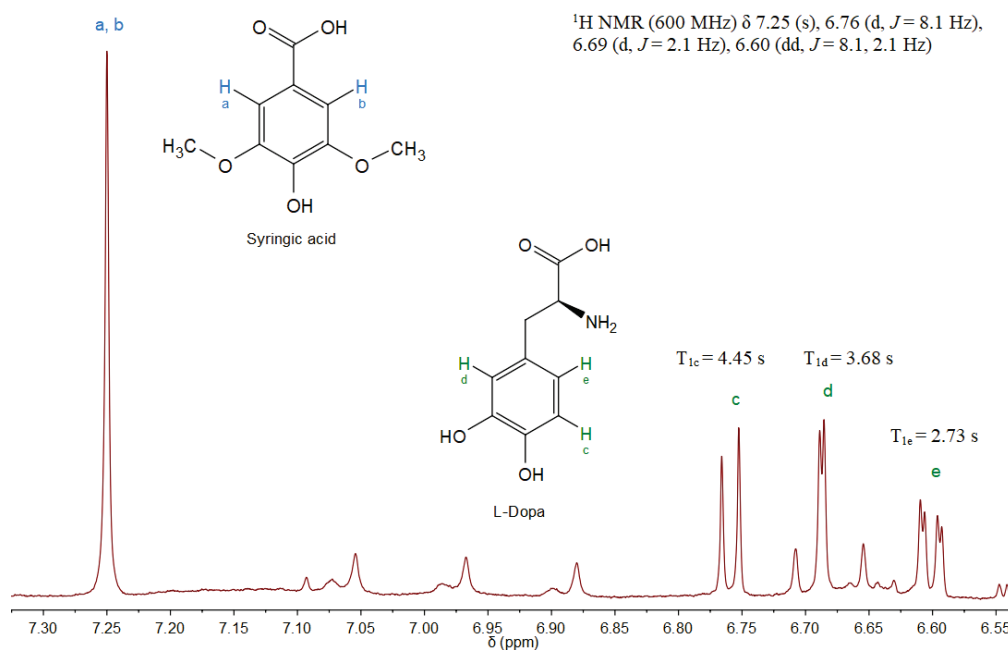
4.2.6.1 Acquisition of the ^1H NMR spectra. For the maximum signal intensity of quantitative NMR analysis, it is important to optimize two parameters: the relaxation time of the analytes and the 90° pulse width. The inversion recovery-pulse sequence was used to calculate spin-lattice relaxation, T_1 , in L-Dopa, while the 90° pulse width was 5.6 μs .²⁰ In the measurement of the standard L-Dopa solution, the highest value at T_1 was 4.45 s, corresponding to the L-Dopa signal with the greatest chemical shift (Figure 1). The relaxation time was considered to be between 3 and 5 times T_1 , and therefore it was fixed at 15 s to reduce the total acquisition time of the spectrum as much as possible (Table 1). The sequence chosen for the measurement of calibration standards and extracts was the double-pulsed field gradient spin echo (DPFGSE) to suppress the water signal.

Table 1. Values of acquisition parameters for NMR analyses

Parameter	Value
Solvent	0.1 M HCl·H ₂ O:D ₂ O:DMSO-d ₆ (8:1:1)
Temperature	26.0 °C
Number of scans	32
Receiver gain	Auto
Relaxation delay	15 s
Pulse width	5.6 μs
Acquisition time	3 s

4.2.6.2 Treatment of ¹H NMR spectra. All the spectra were apodized with the exponential function at 0.3 Hz, filling with zeros at 64K, and were submitted to manual phase adjustment as well as manual correction of the base line. GSD (global spectral deconvolution) and sum integration were used as peak picking and integration methods, respectively. Two fitting cycles were used for the refinement level and an optimized value for the peaks of one, as parameters of the GSD method.

4.2.6.3 Settings used in the qNMR plug-in of Mnova. The peak used as internal reference was the signal at δ_H 7.25 of the syringic acid. The Multiplet Integration method with GSD peak picking was selected without applying line fitting automatically. The multiplet signals of L-Dopa selected to calculate their concentration were c, d, and e (Figure 1).

**Figure 1.** ¹H NMR spectrum of the aromatic area of the MPP seed extract with syringic acid

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 Optimization of the L-Dopa extraction process

Two varieties of *Mucuna pruriens* with a high content of L-Dopa (MPK and MPP) were selected. The complete extraction of L-Dopa in these seed samples required a reflux extraction procedure. The number of extraction cycles needed was also evaluated. A less vigorous extraction at room temperature did not guarantee this complete extraction. Six samples (10 g per sample) of each type of seed were taken. All of these were extracted as described in the Material and Methods section, but samples 3 and 4 were extracted twice while 5 and 6 were extracted three times successively. For each sample, the 50-mL solutions obtained in each extraction cycle were added. The aliquot volume (V_a) was 0.2, 0.4 or 0.6 mL for samples with one, two or three extraction cycles, respectively. These aliquots were treated as indicated in Section 2.4.

The results of the percentage of L-Dopa in the *M. pruriens* seeds according to the number of extraction cycles (Table 2) were compared by means of the ANOVA analysis. The P_{lof} values were 0.496 and 0.059 for MPP and MPK, respectively. Therefore, it was concluded, with a 95% certainty, that the L-Dopa concentration did not significantly differ according to the number of extraction cycles. Therefore, only one cycle was chosen in order to reduce the cost and time of the extraction process.

Table 2. Percentage of L-Dopa in two varieties of *Mucuna pruriens* seeds according to the number of extraction cycles

Cycles	% of L-Dopa in MPP (SD)	% of L-Dopa in MPK (SD)
1	3.0 (0.2)	3.0 (0.2)
2	3.1 (0.2)	3.6 (0.3)
3	3.0 (0.2)	3.4 (0.2)

SD: standard deviation

4.3.2 Identification and assignment of the signals of L-Dopa and syringic acid

Figure 1 shows the aromatic region of the ^1H NMR spectrum of the ground extract of MPP seeds, with syringic acid as an internal standard. This standard was chosen because it had a singlet signal at δ_{H} 7.25, which was easy to quantitate, in the region of the aromatic protons, and which did not interfere with the corresponding L-Dopa signals at δ_{H} 6.76, 6.69, and 6.60. The L-Dopa and the syringic acid signals were assigned using the ^1H NMR spectrum of a calibration solution (4500 $\mu\text{g/mL}$) and by comparing them with spectra in the literature.¹⁹

4.3.3 Method validation

The qNMR plug-in of the MNova NMR software was used for the NMR analyses. This analytical method was validated in terms of sensitivity, accuracy, and reproducibility. In addition, accuracy and reproducibility were assessed by a NMR calibration curve in order to compare the results of the two calculation methods.

The NMR calibration curve was constructed using the relative area (A_r) against the concentration (C , $\mu\text{g/L}$) of L-Dopa (Eq. 1).

$$A_r = -0.002 + 0.001087 \times C \text{ (Eq. 1)}$$

The relative area is defined as the ratio between the signal area of the analyte and the signal area of the internal standard (syringic acid). For each calibration level, three relative areas corresponding to the aromatic signals of L-Dopa were determined. The weighted least-squares analysis was used for the inverse of the concentration as weights (Table S1 and Figure S2).

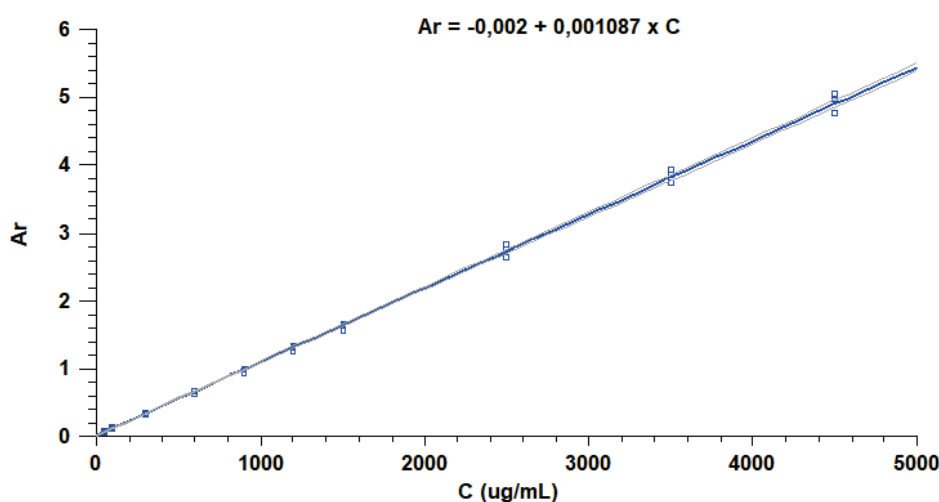


Figure S2. Calibration function

4.3.3.1 Sensitivity

The limit of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were calculated using the signal-to-noise ratio (S:N) only of the less intense signal of L-Dopa, the double-doublet at δ_{H} 6.60. The concentration for S:N = 3 and for S:N = 10, were set as LOD and LOQ, respectively (Table S1). LOD and LOQ, calculated for 2 mL of aliquot (maximum aliquot that results in a soluble dry residue in 0.7 mL), and expressed in terms of mg/g of dry material extract, have values of 0.0175 mg/g and 0.0578 mg/g, respectively.

Table S1. Analytical and statistical parameters of calibration curve

Parameter	Value	Parameter	Value
n	30	P _{lof}	0.604
Weight	1/X	LOD (µg/mL)	10
b	1.087·10 ⁻³	LOD (µM)	51
S _b	6.2·10 ⁻⁶	LOQ (µg/mL)	33
S _{y/x}	1.22·10 ⁻³	LOQ (µM)	167
R ² (%)	99.91	LDR (µg/mL)	33-4500

n: points of calibration; b: slope; S_b: slope standard deviation; S_{y/x}: regression standard deviation; R²: determination coefficient; P_{lof}: P value of lack-of-fit test; LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification; LDR: linear dynamic range.

4.3.3.2 Accuracy (precision and trueness)

The accuracy of this analytical method was evaluated using 0.5 mL of *Vicia faba* *Aguadulce* extracts, spiked at three different concentration levels for the L-Dopa (4500 µg/mL, 1200 µg/mL, and 90 µg/mL). The precision was expressed as the relative standard deviation (% RSD) and calculated for eight spiked aliquots for each concentration level (Table 3).

Table 3. Accuracy of the analytical method to determine L-Dopa in *Mucuna pruriens*

Spiked (µg/mL)	qNMR		Calibration	
	^a R (%)	^b RSD (%)	^a R (%)	^b RSD (%)
4500	101.2	7.3	103.8	7.4
1200	102.9	6.5	104.2	6.9
90	98.1	8.4	106.7	8.7

^a R (%): recovery (mean of 8 determinations)

^b RSD (%): relative standard deviation (mean of 8 determinations)

The RSD values of both methodologies, which ranged between 6.5% and 8.7%, were lower than the accepted limit (15%) by US Food and Drug Administration (FDA) Guideline for the Bioanalytical Method Validation.²¹ The trueness was expressed in terms of recovery (% R), which was defined as the relationship between the experimental and the theoretical concentration of L-Dopa in spiked aliquots. The recoveries for qNMR and calibration were close to the ideal value, 100%, in all cases (98.1–106.7%) (Table 3). Therefore, measurements of the concentration of L-Dopa by ¹H NMR using qNMR can be considered to be as accurate as those of the calibration, within the concentration range studied.

4.3.3.3 Reproducibility

For an evaluation of the reproducibility of the complete quantitation method, including the extraction step, eight samples of ground extract of MPK seeds were extracted, two per day for four consecutive days, as described in Section 2.4. The concentration of L-Dopa, expressed in percentage by weight (% w/w), was determined (Eq. 2). As the concentration unit of the calibration curve was $\mu\text{g/mL}$, it was necessary to convert $\mu\text{g/mL}$ to % (w/w).

$$C(\%) = C \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \cdot \frac{0.7 \text{ mL}}{V_a(\text{mL})} \cdot \frac{50 \text{ mL}}{10 \text{ g}} \cdot 10^{-6} \frac{\text{g}}{\mu\text{g}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

The concentration of each of these eight samples was calculated by qNMR, as well as its corresponding calibration (Table 4). From these data, the RSD values were 7.5% and 7.3%, respectively, indicating that the method is reproducible. In addition, the means of both calculation methods were statistically equal (3.0 for qNMR and 3.1 for calibration).

Table 4. Reproducibility of the analytical method to determine L-Dopa in *Mucuna pruriens*.

Sample	% of L-Dopa (SD)	
	qNMR	Calibration
S1	3.0 (0.2)	3.0 (0.2)
S2	3.1 (0.2)	3.1 (0.2)
S3	2.9 (0.3)	3.1 (0.3)
S4	3.0 (0.2)	3.1 (0.2)
S5	3.0 (0.2)	3.1 (0.3)
S6	3.2 (0.3)	3.3 (0.2)
S7	3.0 (0.3)	3.1 (0.3)
S8	3.1 (0.3)	3.2 (0.3)

SD: standard deviation

4.3.4 ^1H NMR Quantitation of L-Dopa

The quantitation was applied to three samples, two seeds of *M. pruriens* (MPK and MPP) and commercial Zandopa. Each sample was prepared in duplicate and three aliquots were analyzed per sample. As in the validation of the analytical methodology, the quantitation was calculated using the methods single point qNMR and NMR calibration curve (Table 5). For the same sample, the difference in results using both

calculation methods did not prove statistically significant. The percentages of L-Dopa detected in MPK and in MPP were very similar, between 3.0 and 3.2%, these values being within the range published for this species (3–6%).³ For the commercial Zandopa, the percentage of L-Dopa was around 2.5%, somewhat lower than in the seeds of *M. pruriens*.

Table 5. Quantitation of L-Dopa by qNMR and NMR calibration curve in seeds of two varieties of *Mucuna pruriens* and in commercial Zandopa.

Sample	V_a (mL)	% of L-Dopa (SD)	
		qNMR	Calibration
Zandopa	0.2	2.6 (0.2)	2.5 (0.2)
MPP	0.2	3.2 (0.2)	3.0 (0.2)
MPK	0.2	3.0 (0.2)	3.1 (0.2)

SD: standard deviation

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the plant nursery “Semillero FeryBel S.L.” for caring for the seeds of the two varieties of *Mucuna pruriens* and the seeds of *Vicia faba Aguadulce* (VFA), and for keeping the seeds on deposit. We also thank David Nesbitt for reviewing the English of the manuscript.

4.4 REFERENCES

1. Gautam M, Chandel M, Azmi, W. Therapeutic role of L-DOPA produced as a secondary metabolite from different legumes and plant sources. *Ann Phytomed* 2012;1:1–8.
2. Kavitha C, Thangamani C. Amazing bean “Mucuna pruriens”: a comprehensive review. *J Med Plants Res* 2014;8:138–143.
3. Pugalenti M, Vadivel V, Siddhuraju P. Alternative food/feed perspectives of an underutilized legume *Mucuna pruriens* var. utilis – a review. *Plant Foods Hum Nutr* 2005;60:201–218.
4. Gandhi NP, Vaidya ADB. Management of Parkinson’s disease in Ayurveda: Medicinal plants and adjuvant measures. *J Ethnopharm* 2017;197:46–51.
5. Jansen RLM, Brogan B, Whitworth AJ, Okello EJ. Effects of five ayurvedic herbs on locomotor 121ictogra in a drosophila melanogaster parkinson’s disease model. *Phytother Res* 2014;28:1789–1795.
6. Cassani E, Cilia R, Laguna J, Barichella M, Contin M, Cereda E, Isaias IU, Sparvoli F, Akpalu A, Budu KO, Scarpa MT, Pezzoli G. Mucuna pruriens for Parkinson’s disease: Low-cost preparation method, laboratory measures and pharmacokinetics profile. *J Neurol Sci* 2016;365:175–180.
7. Di Stefano A, Sozio P, Cerasa LS. Antiparkinson prodrugs. *Molecules* 2008;13:46–68.
8. Tharakan B, Dhanasekaran M, Mize-Berge J, Manyam BV. Anti-Parkinson botanical Mucuna pruriens prevents levodopa induced plasmid and genomic DNA damage. *Phytother Res* 2007;21:1124–1126.
9. Shah PB, Joshi B. Estimation of L-dopa from Mucuna pruriens Linn and formulations containing M. pruriens by spectrofluorimetric method. *Int J PharmTech Res* 2010;2:1033–1036.
10. Singh RM, Saini PK, Mathur SC, Singh GN, Kumar S. Application of high performance liquid chromatography to the determination and validation of levodopa in methanolic extract of Mucuna utilis. *Int J Green Pharm* 2010;4:156–158.
11. Rathod BG, Patel NM. Development of validated RP-HPLC method for the estimation of L-Dopa from Mucuna pruriens, its extracts and in Aphrodisiac formulation. *Int J Pharma Sci Res* 2014;5:508–513.
12. Modi KP, Patel NM, Goyal RK. Estimation of L-Dopa from Mucuna pruriens LINN and formulations containing M. pruriens by HPTLC method. *Chem Pharm Bull* 2008;56:357–359.

13. Zhang Y, Gao S. Determination of 122ictogram levels of levodopa in pharmaceutical preparations and biofluids by flow-injection chemiluminescence. *Adv Mater Res* 2014;884–885:566–569.
14. Stankovic DM, Samphao A, Dojcinovi B, Kalcher K. Rapid electrochemical method for the determination of L-DOPA in extract from the seeds of *Mucuna prurita*. *Acta Chim Slov* 2016;63:220–226.
15. Li X, Chen Z, Yang F, Pan J, Li Y. Development of a microchip-pulsed electrochemical method for rapid determination of L-DOPA and tyrosine in *Mucuna pruriens*. *J Sep Sci* 2013;36:1590–1596.
16. Gödecke T, Napolitano JG, Rodriguez-Brasco MF, Chen S-N, Jaki BU, Lankin DC, Pauli GF. Validation of a generic quantitative ^1H NMR method for natural products analysis. *Phytochem Anal* 2013;24:581–597.
17. Bharti SK, Roy R. Quantitative ^1H NMR spectroscopy. *Trends Anal Chem* 2012;35:5–26.
18. Pauli GF, Godecke T, Jaki BU, Lankin DC. Quantitative ^1H NMR. Development and potential of an analytical method: An update. *J Nat Prod* 2012;75:834–851.
19. Talebpour Z, Haghgoo S, Shamsipur M. ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis for simultaneous determination of levodopa, carbidopa and methyl dopa in human serum and pharmaceutical formulations. *Anal Chim Acta* 2004;506:97–104.
20. Claridge TDW. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry. Second Edition*. Oxford: Elsevier Ltd editorial; 2009. 22–23 p.
21. Guidance for Industry: *Bioanalytical Method Validation*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM), 2001.

4.5 SUPPORTING INFORMATION

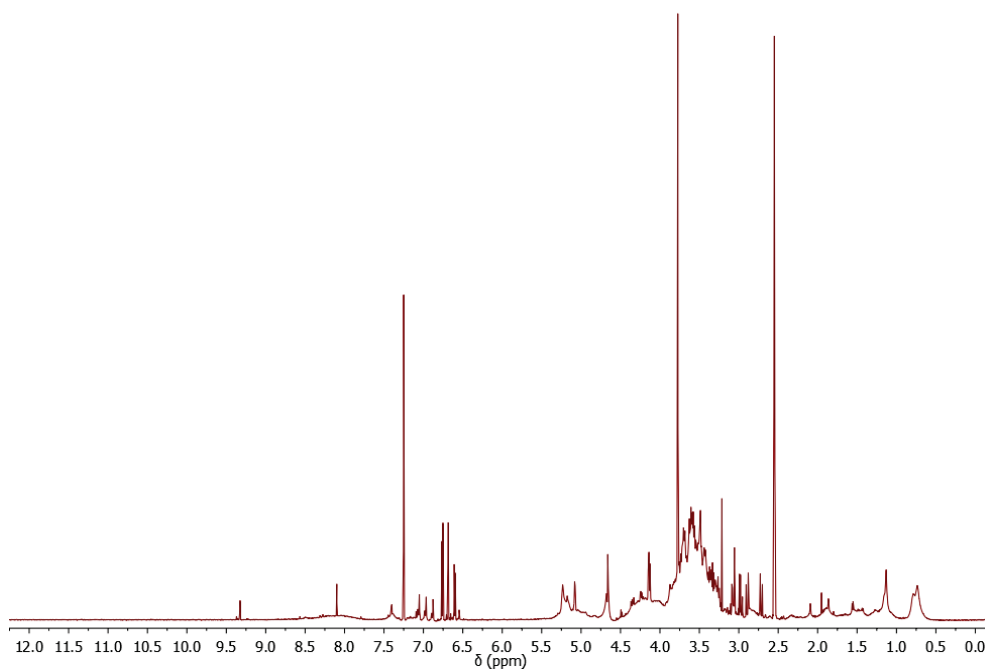


Figure S3. ¹H NMR spectrum of MPK seed extract with syringic acid

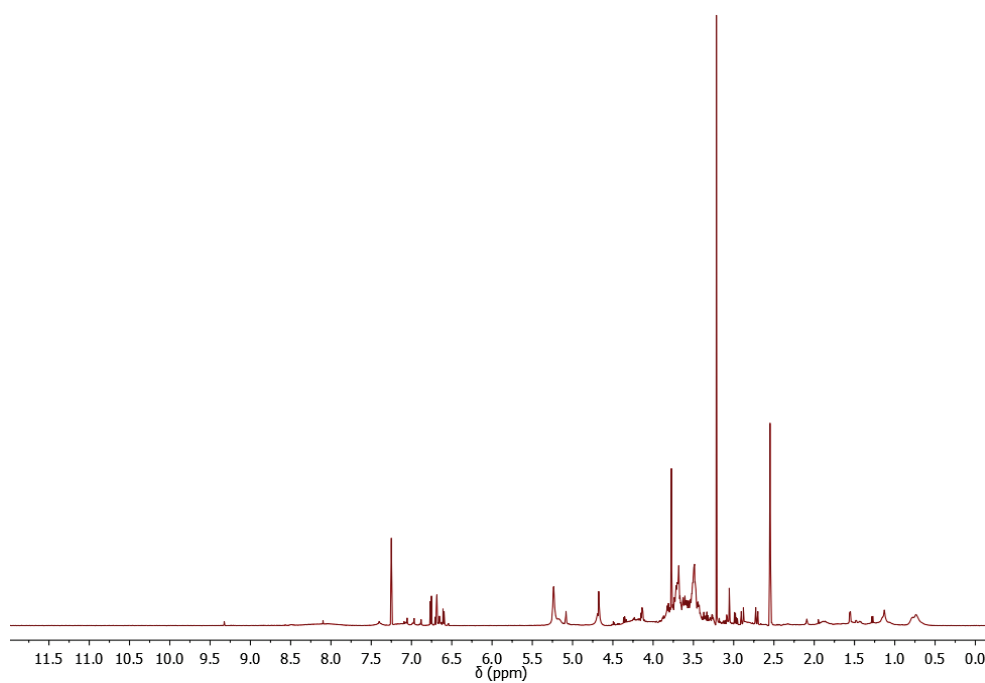


Figure S4. ¹H NMR spectrum of MPP seed extract with syringic acid

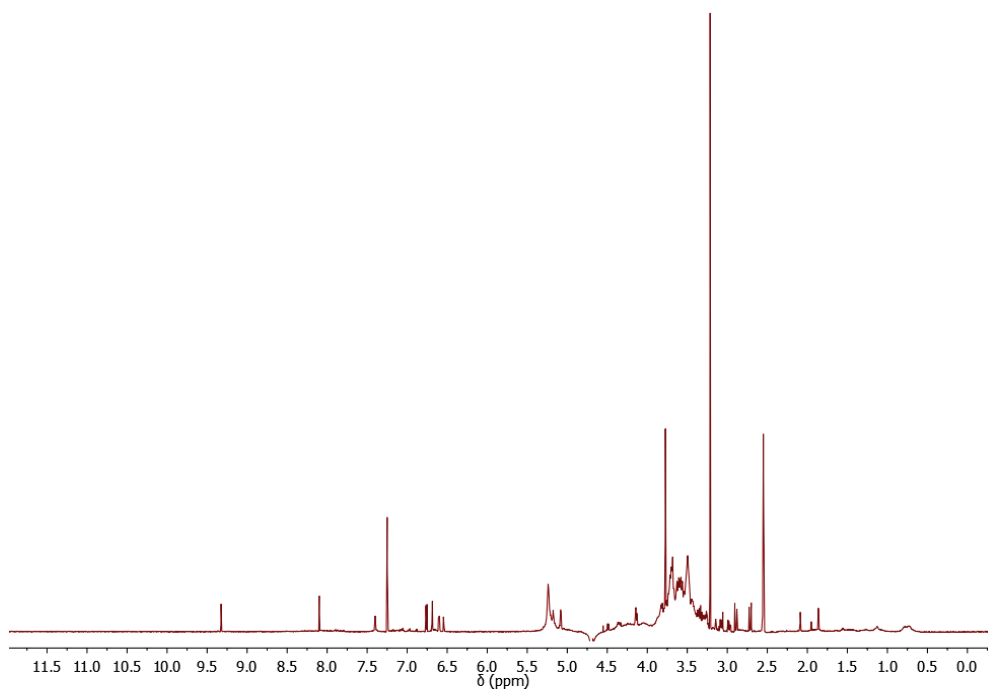


Figure S5. ¹H NMR spectrum of commercial Zandopa with syringic acid

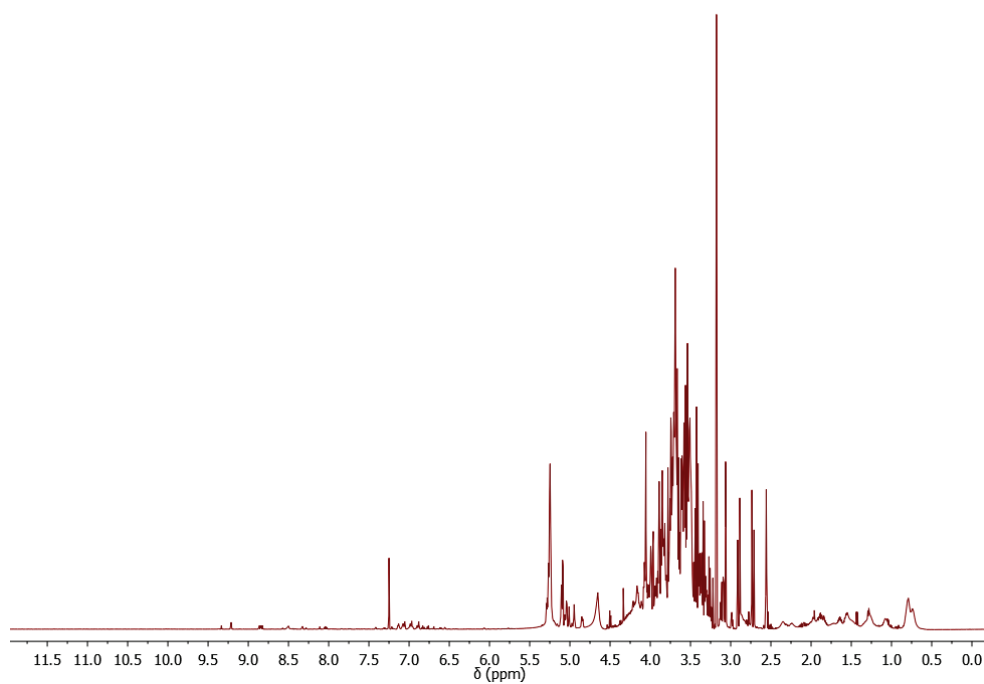


Figure S6. ¹H NMR spectrum of VFA seed extract with syringic acid

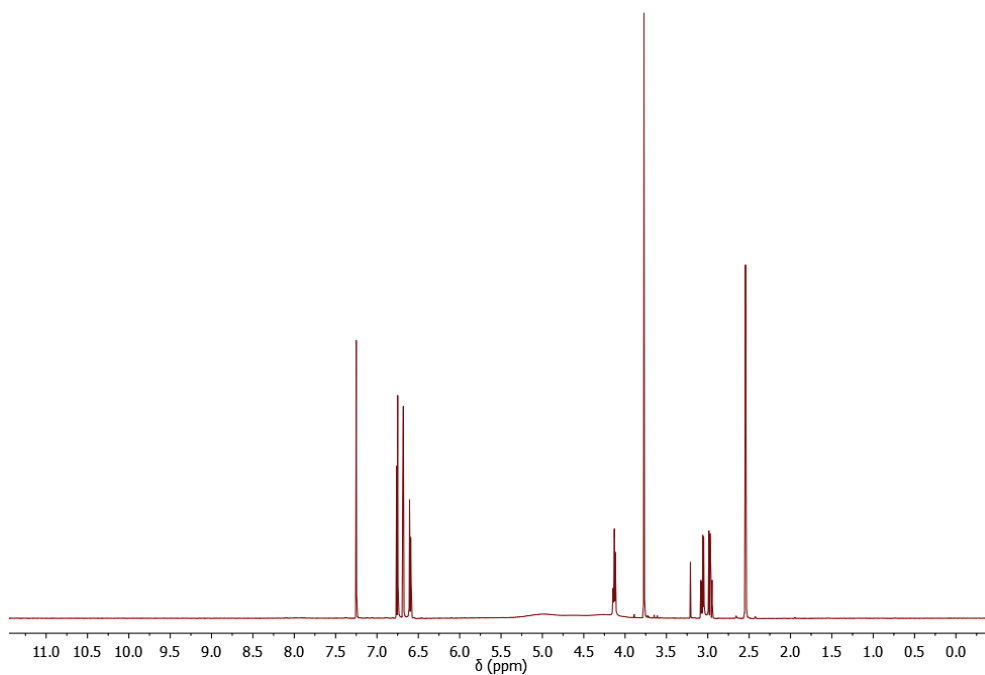
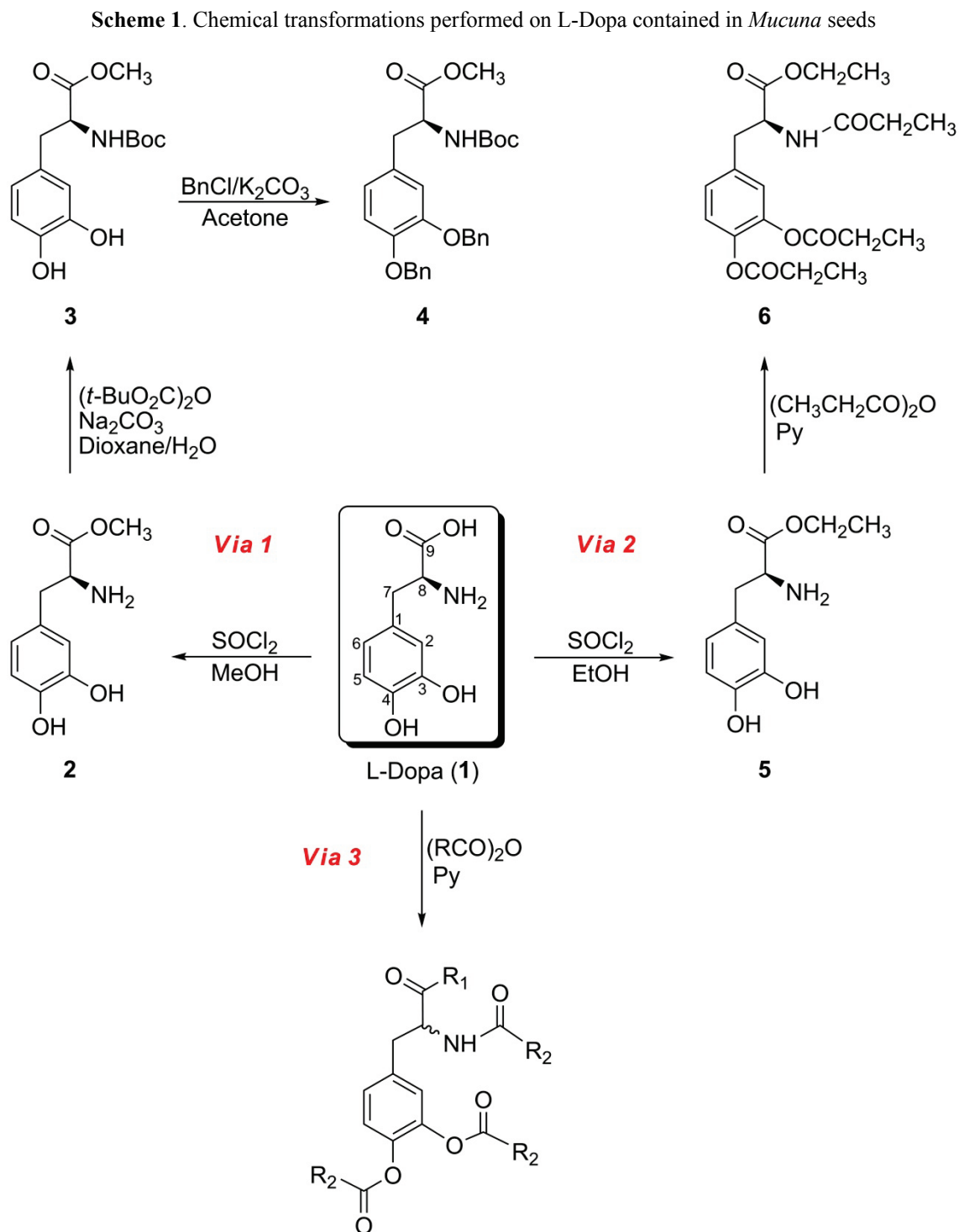


Figure S7. ^1H NMR spectrum of the calibration solution at 1500 $\mu\text{g/mL}$ of L-Dopa

4.6 CHEMICAL SEMI-SYNTHESSES OF L-DOPA DERIVATIVES

Semi-syntheses of several L-Dopa derivatives were made by three different pathways (Scheme 1).



7: $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ (C-10), $\text{R}_2 = \text{CH}_3$

8: $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ (C-10 and C-11), $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$

9: $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (C-10, C-11 and C-12), $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$

Via 1 (three steps). Cooled MeOH (10 mL) and thionyl chloride (SOCl₂, 0.25 mL) were added dropwise to a sample of ground extract of MPP or MPK seeds (1 g). The reaction mixture was stirred for 18 h at room temperature. This reaction mixture was then filtered and the liquid extract was concentrated. The solid residue was dissolved in CH₂Cl₂, washed with a saturated aqueous sodium bicarbonate solution (NaHCO₃), with water, and finally with a saturated brine solution. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate (Na₂SO₄), filtered, and concentrated. The residue was purified by column chromatography, giving the hydrochloride derivative of compound **2**.

The entire above solid residue, containing compound **2**, was dissolved in dioxane (5 mL) and 10% aqueous sodium carbonate (Na₂CO₃, 5 mL) was added. The resulting solution was cooled to 0 °C and di-*tert*-butyl-dicarbonate 1 M (BOC) in dioxane (2.5 mL) was added dropwise. This solution was stirred for 18 h at room temperature. The organic solvent was then removed and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate three times. The combined organic extracts were subsequently washed with water, a 5% HCl solution, water, and a saturated brine solution. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The residue was purified by column chromatography to give compound **3**.

The whole solid residue previously obtained, which contained compound **3**, was dissolved in acetone (10 mL), and potassium carbonate (K₂CO₃, 2 g) and benzyl chloride (BnCl, 1 mL) were added. The solution was refluxed for 6 h and then cooled and concentrated. This residue was dissolved in CH₂Cl₂ and the solution was washed successively with water, a 5% HCl solution, water, and a saturated brine solution. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, concentrated, and purified in flash chromatography, yielding product **4**.

Via 2 (two steps). Cooled ethanol (EtOH, 10 mL) and thionyl chloride (SOCl₂, 0.25 mL) were added dropwise to a sample of ground extract of MPP or MPK seeds (1 g). The reaction mixture was stirred for 18 h at room temperature. This reaction mixture was filtered and the liquid extract concentrated. The solid residue was dissolved in CH₂Cl₂ and washed successively with a saturated aqueous solution of NaHCO₃, water, and a saturated brine solution. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The residue was purified by column chromatography to give compound **5**.

The entire above solid residue, containing compound **5**, was dissolved in pyridine (5 mL) and treated with propionic anhydride (1 mL). The solution was stirred for 1 h at room temperature and then concentrated. The solid residue was dissolved in CH₂Cl₂ and washed successively with a saturated aqueous solution of NaHCO₃, water, and a saturated brine solution. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, concentrated, and purified in flash chromatography, yielding product **6**.

(*S*)-4-(3-ethoxy-3-oxo-2-propionamidopropyl)-1,2-phenylene dipropionate (**6**): colorless oil; $[\alpha]_D^{25} + 0.4^\circ$ (*c* 1 in CHCl_3); IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3314, 2941, 2980, 1756, 1734; ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR (CDCl_3), see Tables S1 and S2; ESI-HRMS m/z 394.1884 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{NO}_7$, 394.1866).

Via 3 (one step). Acetic, propionic or butyric anhydride (1 mL each) in pyridine (4 mL each) were added respectively to three samples of ground extract of MPP or MPK seeds (1 g each). The reaction mixtures were stirred at 80 °C for 5 h, and then filtered and concentrated. Each residue was dissolved in CH_2Cl_2 and each organic solution was washed successively with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 , water, and with a saturated brine solution. Each organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, concentrated, and purified in flash chromatography. Thus, compounds **7** (from acetic anhydride), **8** (from propionic anhydride) and **9** (from butyric anhydride) were obtained, respectively.

4-(3,4-diacetoxyphenyl)-3-acetamido-2-butanone (**7**): colorless oil; IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3314, 2980, 2940, 1760, 1734; ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR (CDCl_3), see Tables S1 and S2; ESI-HRMS m/z 322.1288 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_6$, 322.1291).

5-(3,4-dipropionyloxyphenyl)-4-propionamido-3-pentanone (**8**): colorless oil; IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3304, 2978, 2941, 1757, 1715; ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR (CDCl_3), see Tables S1 and S2; ESI-HRMS m/z 378.1918 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{NO}_6$, 378.1917).

6-(3,4-dibutyroxyphenyl)-5-butyroamido-4-hexanone (**9**): colorless oil; IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3306, 2963, 2935, 2875, 1755; ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR (CDCl_3), see Tables S1 and S2; ESI-HRMS m/z 434.2550 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{NO}_6$, 434.2543).

Table S1. ¹H NMR spectroscopic data for compounds 6–9^a

Position	δ_{H} 6 (<i>J</i> in Hz)	δ_{H} 7 (<i>J</i> in Hz)	δ_{H} 8 (<i>J</i> in Hz)	δ_{H} 9 (<i>J</i> in Hz)
2	6.95, d (2.0)	6.97, d (2.1)	6.96, d (2.0)	6.95, d (2.1)
5	7.09, d (8.2)	7.11, d (8.2)	7.10, d (8.2)	7.09, d (8.2)
6	6.98, dd (8.2, 2.0)	7.00, dd (8.2, 2.1)	6.98, dd (8.2, 2.0)	6.98, dd (8.2, 2.1)
7	3.12, AB system (5.9)	3.12, dd (14.3, 6.8)	3.06, dd (14.1, 7.0)	3.07, dd (14.2, 7.0)
	3.12, AB system (5.9)	3.06, dd (14.3, 5.6)	3.02, dd (14.1, 6.0)	3.02, dd (14.2, 5.9)
8	4.85, ddd (7.6, 5.9, 5.9)	4.83, ddd, (7.1, 6.8, 5.6)	4.83, ddd (7.5, 7.0, 6.0)	4.85, ddd (7.4, 7.0, 5.9)
10	-	2.18, s	2.43, c (7.2)	2.39, m
11	-	-	1.02, t (7.2)	1.57, m
12	-	-	-	0.87, t (7.4)
NH	5.97, d (7.6)	6.14, d (7.1)	6.16, d (7.5)	6.09, d (7.4)
CH ₃ CH ₂ CONH	2.22, q (7.6)	-	2.21, q (7.6)	-
CH ₂ CH ₂ CONH	1.13, t (7.6)	-	1.12, t (7.6)	-
CH ₃ CH ₂ COO	2.55, q (7.5)	-	2.55, q (7.6)	-
CH ₃ CH ₂ COO	2.54, q (7.5)	-	2.55, q (7.6)	-
CH ₂ CH ₂ COO	1.24, t (7.5)	-	1.25, t (7.6)	-
CH ₂ CH ₂ COO	1.24, t (7.5)	-	1.25, t (7.6)	-
CH ₃ CH ₂ OCO	4.14, q (7.2)	-	-	-
CH ₂ CH ₂ OCO	1.23, t (7.2)	-	-	-
CH ₂ CONH	-	1.99, s	-	-
CH ₃ COO	-	2.27, s	-	-
CH ₃ COO	-	2.28, s	-	-
CH ₃ CH ₂ CH ₂ CONH	-	-	-	2.16, t (7.4)
CH ₃ CH ₂ CH ₂ CONH	-	-	-	1.62, m
CH ₂ CH ₂ CH ₂ CONH	-	-	-	0.91, t (7.4)
CH ₃ CH ₂ CH ₂ COO	-	-	-	2.50, t (7.4)
CH ₃ CH ₂ CH ₂ COO	-	-	-	2.50, t (7.4)
CH ₃ CH ₂ CH ₂ COO	-	-	-	1.76, sex (7.4)
CH ₃ CH ₂ CH ₂ COO	-	-	-	1.76, sex (7.4)
CH ₂ CH ₂ CH ₂ COO	-	-	-	1.03, t (7.4)
CH ₂ CH ₂ CH ₂ COO	-	-	-	1.03, t (7.4)

^a Overlapped ¹H NMR signals are reported without designated multiplicity

Table S2. ^{13}C NMR spectroscopic data for compounds 6–9

Position	δ_{C} 6	δ_{C} 7	δ_{C} 8	δ_{C} 9
1	134.8	134.8	134.9	134.8
2	124.6	124.6	124.5	124.6
3	142.1	142.2	142.2	142.2
4	141.3	141.3	141.3	141.3
5	123.4	123.7	123.6	123.7
6	127.3	127.3	127.2	127.2
7	37.4	36.4	36.9	36.8
8	53.0	59.4	58.3	58.4
9	171.6	206.0	209.4	208.8
10	-	28.2	34.4	42.9
11	-	-	7.5	17.0
12	-	-	-	13.7
<u>C</u> ONH	173.6	170.0	173.7	173.0
<u>C</u> OO	171.8	168.4	171.9	171.0
<u>C</u> OO	171.7	168.3	171.8	171.0
CH ₃ <u>C</u> H ₂ CONH	29.6	-	29.6	-
CH ₃ <u>C</u> H ₂ COO	27.6	-	27.6	-
CH ₃ <u>C</u> H ₂ COO	27.6	-	27.6	-
<u>C</u> H ₃ CH ₂ CONH	9.8	-	9.7	-
<u>C</u> H ₃ CH ₂ COO	9.3	-	9.2	-
<u>C</u> H ₃ CH ₂ COO	9.3	-	9.2	-
CH ₃ <u>C</u> H ₂ OCO	61.8	-	-	-
<u>C</u> H ₃ CH ₂ OCO	14.2	-	-	-
<u>C</u> H ₃ CONH	-	23.2	-	-
<u>C</u> H ₃ COO	-	20.8	-	-
<u>C</u> H ₃ COO	-	20.8	-	-
CH ₃ CH ₂ <u>C</u> H ₂ CONH	-	-	-	38.5
CH ₃ <u>C</u> H ₂ CH ₂ CONH	-	-	-	19.1
<u>C</u> H ₃ CH ₂ CH ₂ CONH	-	-	-	13.8
CH ₃ CH ₂ <u>C</u> H ₂ COO	-	-	-	36.0
CH ₃ CH ₂ <u>C</u> H ₂ COO	-	-	-	36.0
CH ₃ <u>C</u> H ₂ CH ₂ COO	-	-	-	18.5
CH ₃ <u>C</u> H ₂ CH ₂ COO	-	-	-	18.5
<u>C</u> H ₃ CH ₂ CH ₂ COO	-	-	-	13.8
<u>C</u> H ₃ CH ₂ CH ₂ COO	-	-	-	13.8

Publicación 3

Journal of Natural Products 2016, 79, 1737–1745.

JCR 2016: 3.281. Q1

JOURNAL OF
NATURAL
PRODUCTS

Article

pubs.acs.org/jnp

Synthesis and Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol Alkyl-Carbonate Derivatives

Ignacio Fernandez-Pastor,[†] Antonia Fernandez-Hernandez,[‡] Francisco Rivas,^{*,†} Antonio Martinez,[†] Andres Garcia-Granados,[†] and Andres Parra^{*,†}

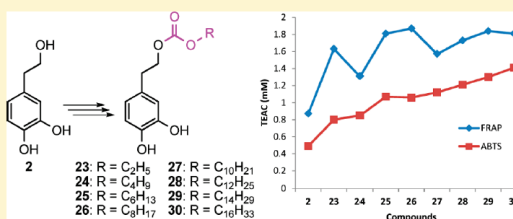
[†]Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Fuentenueva s/n, ES-18071 Granada, Spain

[‡]Centro "Venta del Llano" del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Agroalimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), Mengibar, Jaén 23620, Spain

S Supporting Information

ABSTRACT: Three procedures have been investigated for the isolation of tyrosol (1) and hydroxytyrosol (2) from a phenolic extract obtained from the solid residue of olive milling. These three methods, which facilitated the recovery of these phenols, were chemical or enzymatic acetylation, benzylation, and carbomethoxylation, and subsequent carbonylation or acetonation reactions. Several new lipophilic alkyl-carbonate derivatives of hydroxytyrosol have been synthesized, coupling the primary hydroxy group of this phenol, through a carbonate linker, using alcohols with different chain lengths.

The antioxidant properties of these lipophilic derivatives have been evaluated by different methods and compared with free hydroxytyrosol (2) and also with the well-known antioxidants BHT and α -tocopherol. Three methods were used for the determination of this antioxidant activity: FRAP and ABTS assays, to test the antioxidant power in hydrophilic media, and the Rancimat test, to evaluate the antioxidant capacity in a lipophilic matrix. These new alkyl-carbonate derivatives of hydroxytyrosol enhanced the antioxidant activity of this natural phenol, with their antioxidant properties also being higher than those of the commercial antioxidants BHT and α -tocopherol. There was no clear influence of the side-chain length on the antioxidant properties of the alkyl-carbonate derivatives of 2, although the best results were achieved mainly by the compounds with a longer chain on the primary hydroxy group of this natural phenolic substance.



Today, natural products with antioxidant activity are of great interest as a source for food ingredients and cosmetics. Frequently, epidemiological studies in Mediterranean countries, where the traditional diet is rich in olive oil and unsaturated fatty acids, have shown that there is a low incidence of degenerative diseases, such as heart disease, and certain tumors such as colon cancer.^{1–3}

Extra-virgin olive oil (*Olea europaea* L.; Oleaceae) has a high percentage of several phenolic compounds, in particular, tyrosol (1) and hydroxytyrosol (2). The most abundant natural phenol is 2 (3,4-dihydroxyphenylethanol), an *ortho*-diphenolic compound present in olive oil in free form and also acetylated or as part of several secoiridoid compounds.⁴ Compound 2 is characterized by a high antioxidant activity, comparable to that of conventional synthetic antioxidants such as 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) and *tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA).⁵

Phenols are a large family of natural products, which are able to transfer the hydrogen from the phenolic hydroxyl group to different families of reactive oxygen species (ROS), minimizing the oxidative process in cells.⁶ These phenolic compounds have attracted widespread research attention because of their broad range of biological activities and their potential health benefits, including antimicrobial, anti-inflammatory, anticancer, hypo-

tensive, hypoglycemic, neuroprotective, and apoptotic effects.^{7–12} The food industry continually requires new and powerful antioxidants, with proven functional activities, which preserve the properties of food for a longer storing time and have low cytotoxic effects.

Olive-mill wastes have been employed as a cheap source of the natural phenolic antioxidants 1 and 2.¹³ Hydroxytyrosol (2) can also be produced by chemical or enzymatic hydrolysis of oleuropein, one of the most abundant bioactive compounds of the olive tree.^{14,15} The highly polar nature of 2 determines its solubility in lipophilic media, and consequently several studies on derivatives of this compound with increased lipophilicity as well as on their beneficial properties for human health have appeared in the literature. In recent years, studies have synthesized and evaluated a large number of esters of 1 and 2 in order to improve their functional properties and to use them in diets as well as food stabilizers or cosmetics.^{16–21} In this sense, different studies on plant phenols have shown the importance of the presence of the side chains of these compounds, because their lipophilic nature governs the crossing of the cytoplasmic membranes of cells. These

Received: February 9, 2016

Published: June 23, 2016

Synthesis and Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol Alkyl-carbonate Derivatives

Ignacio Fernandez-Pastor,[†] Antonia Fernandez-Hernandez,[‡] Francisco Rivas,^{*,†} Antonio Martinez,[†] Andres Garcia-Granados[†] and Andres Parra^{*,†}

[†] Departamento de Quimica Organica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Fuentenueva s/n, ES-18071 Granada, Spain

[‡] Centro “Venta del Llano” del Instituto Andaluz de Investigacion y Formacion Agraria, Pesquera, Agroalimentaria y de la Produccion Ecologica (IFAPA), Mengibar, Jaen, Spain

ABSTRACT: Three procedures have been investigated for the isolation of tyrosol (**1**) and hydroxytyrosol (**2**) from a phenolic extract obtained from the solid residue of olive milling. These three methods, which facilitated the recovery of these phenols, were chemical or enzymatic acetylation, benzylation, and carbomethoxylation, and subsequent carbonylation or acetonation reactions. Several new lipophilic alkyl-carbonate derivatives of hydroxytyrosol have been synthesized, coupling the primary hydroxy group of this phenol, through a carbonate linker, using alcohols with different chain lengths. The antioxidant properties of these lipophilic derivatives have been evaluated by different methods, and compared with free hydroxytyrosol (**2**) and also with the well-known antioxidants BHT and α -tocopherol. Three methods were used for the determination of this antioxidant activity: FRAP and ABTS assays, to test the antioxidant power in hydrophilic media, and the Rancimat test, to evaluate the antioxidant capacity in a lipophilic matrix. These new alkyl-carbonate derivatives of hydroxytyrosol enhanced the antioxidant activity of this natural phenol, with their antioxidant properties also being higher than those of the commercial antioxidants BHT and α -tocopherol. There was no clear influence of the side-chain length on the antioxidant properties of the alkyl-carbonate derivatives of **2**, although the best results were achieved mainly by the compounds with a longer chain on the primary hydroxy group of this natural phenolic substance.

5.1 INTRODUCTION

Today, natural products with antioxidant activity are of great interest as a source for food ingredients and cosmetics. Frequently, epidemiological studies in Mediterranean countries, where the traditional diet is rich in olive oil and unsaturated fatty acids, have shown that there is a low incidence of degenerative diseases, such as heart disease, and certain tumors such as colon cancer.¹⁻³

Extra-virgin olive oil (*Olea europaea* L.; Oleaceae) has a high percentage of several phenolic compounds, in particular, tyrosol (**1**) and hydroxytyrosol (**2**). The most abundant natural phenol is **2** (3,4-dihydroxyphenylethanol), an *ortho*-diphenolic compound present in the olive oil in free form, and also acetylated or as part of several secoiridoid compounds.⁴ Compound **2** is characterized by a high antioxidant activity, comparable to that of conventional synthetic antioxidants such as 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) and *tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA).⁵

Phenols are a large family of natural products, which are able to transfer the hydrogen from the phenolic hydroxyl group to different families of reactive oxygen species (ROS), minimizing the oxidative process in cells.⁶ These phenolic compounds have attracted widespread research attention because of their broad range of biological activities and their potential health benefits, including antimicrobial, anti-inflammatory, anticancer, hypotensive, hypoglycemic, neuroprotective, and apoptotic effects.⁷⁻¹² The food industry continually requires new and powerful antioxidants, with proven functional activities, which preserve the properties of food for a longer storing time, and have low cytotoxic effects.

Olive-mill wastes have been employed as a cheap source of the natural phenolic antioxidants **1** and **2**.¹³ Hydroxytyrosol (**2**) can also be produced by chemical or enzymatic hydrolysis of oleuropein, one of the most abundant bioactive compounds of the olive tree.^{14,15} The highly polar nature of **2** determines its solubility in lipophilic media, and consequently several studies on derivatives of this compound with increased lipophilicity as well as on their beneficial properties for human health have appeared in the literature. In recent years, studies have synthesized and evaluated a large number of esters of **1** and **2** in order to improve their functional properties and to use them in diets as well as food stabilizers or cosmetics.¹⁶⁻²¹ In this sense, different studies on plant phenols have shown the importance of the presence of the side-chains of these compounds, because their lipophilic nature governs the crossing of the cytoplasmic membranes of cells. These lipophilic phenolic derivatives have shown good solubility in oils and emulsions and are used as additives in food and cosmetics, and in several pharmaceutical preparations.²¹⁻²⁸

The aim of this investigation was to synthesize a set of alkyl-carbonate derivatives of hydroxytyrosol (**2**), attaching several alcohols with different chain lengths, through a carbonate linker, on the primary hydroxy group of this phenol. The antioxidant activities of these alkyl-carbonate derivatives of **2** have been investigated by

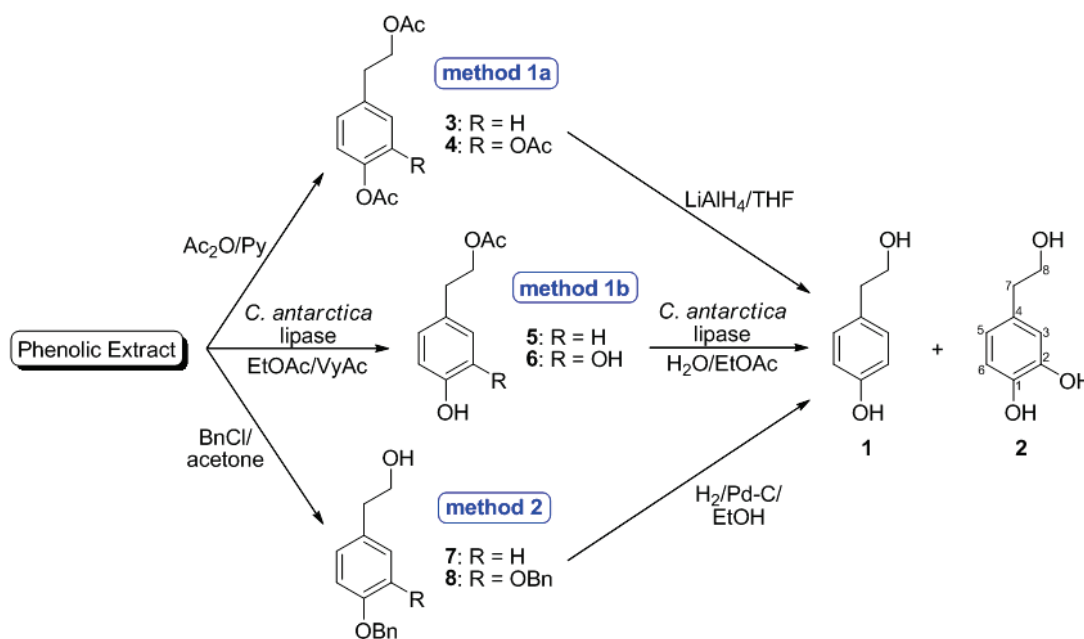
comparison with free **2** and other phenolic substances, with known antioxidant properties, using several determination methods (Rancimat, FRAP, ABTS).

5.2 RESULTS AND DISCUSSION

The complete chemical acetylation of the phenolic compounds (tyrosol, **1**, and hydroxytyrosol, **2**), present in the phenolic extract from the solid wastes of the olive-oil industry, was achieved in presence of $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}$ (method 1a, Scheme 1). Thus, the diacetylated derivative (**3**) and the triacetylated derivative (**4**) were obtained. Alternatively, the selective enzymatic acetylation of the primary hydroxy group of both phenolic compounds was performed using *Candida antarctica* lipase (CAL) in ethyl acetate and vinyl acetate (method 1b, Scheme 1).²¹ Thus, the monoacetylated derivatives **5** and **6** were produced. All of these acetylated derivatives (**3-6**) could then be easily separated by column chromatography. Next, the derivatives (**3** and **4**) were deacetylated by treatment with LiAlH_4 , yielding tyrosol (**1**) and hydroxytyrosol (**2**). The derivatives **5** and **6** were also deacetylated, respectively, using *Candida antarctica* lipase (CAL) in ethyl acetate, also yielding pure **1** and **2**.

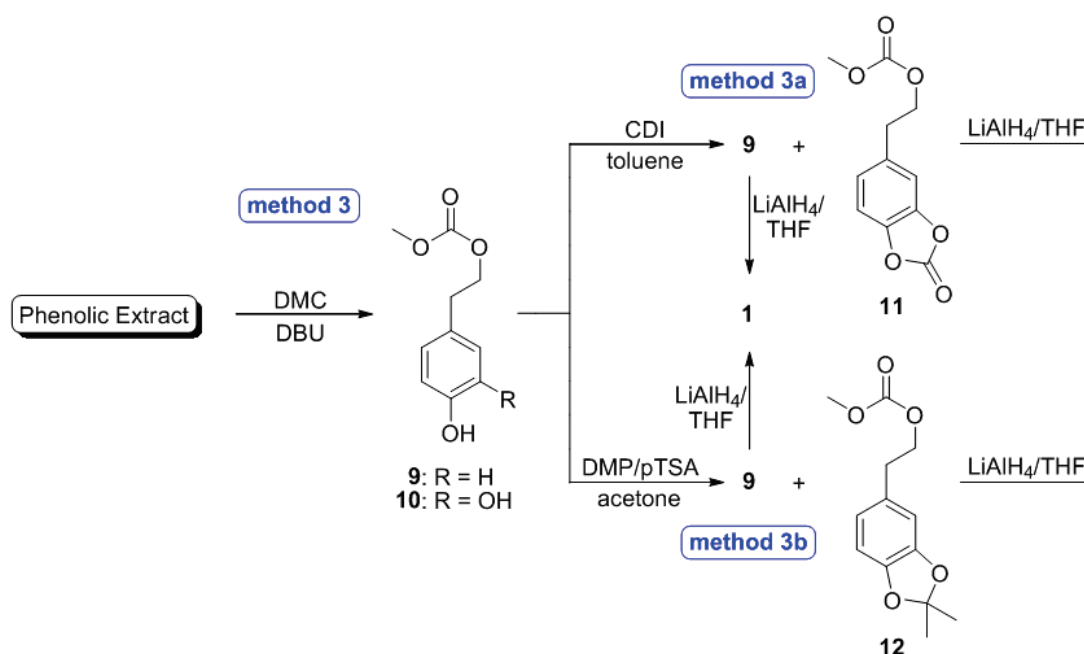
On the other hand, the phenolic hydroxy groups of both phenolic compounds (**1** and **2**) were protected through a benzylation process (method 2, Scheme 1), this providing another procedure to isolate these compounds.²⁹ Thus, the treatment of this phenolic extract with benzyl chloride produced the benzylated derivatives **7** and **8**. These two derivatives were separated chromatographically more easily, and then were debenzylated by catalytic hydrogenation, giving **1** and **2** with good yields.

Scheme 1. Isolation of tyrosol (**1**) and hydroxytyrosol (**2**) by chemical (method 1a) or enzymatic (method 1b) acetylation, and by benzylation (method 2).



Finally, the protection of the primary hydroxy group of these phenolic compounds (**1** and **2**), with dimethyl carbonate, and the subsequent protection of the phenolic hydroxy groups by a carbonylation or an acetonation reaction gave the third procedure to isolate these compounds (method 3, Scheme 2). Thus, the treatment of the phenolic extract with dimethyl carbonate produced the methyl carbonate derivatives **9** and **10**.³⁰ The two compounds were separated with some difficulty to be spectroscopically identified. For a better separation of the two compounds, this mixture (**9** and **10**) was subjected to a carbonylation or an acetonation reaction to produce less polar derivatives (**11** and **12**) of the methyl carbonate hydroxytyrosol (**10**), respectively.

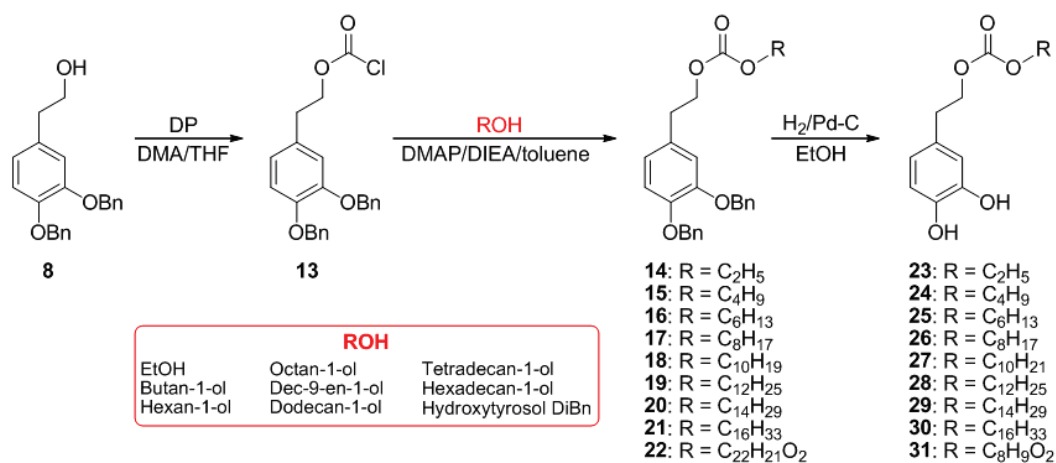
Scheme 2. Isolation of tyrosol (**1**) and hydroxytyrosol (**2**) by carbomethoxylation (method 3) and subsequent carbonylation (method 3a) or acetonation (method 3b).



The indirect isolation of tyrosol (**1**) and hydroxytyrosol (**2**), through the formation of more lipophilic derivatives, made the recovery of these compounds easier than their direct isolation from the natural raw materials, due to a better chemical-physical handling of these compounds, implying a higher extraction rate.

The dibenzylated derivative of hydroxytyrosol (**8**), with two benzyl groups protecting the phenolic hydroxy groups, was used as the starting material to synthesize the new compounds. The coupling reaction of this compound (**8**), through a chloroformate derivative (**13**), with alkyl alcohols of different chain lengths, allowed the synthesis of a set of alkyl-carbonate derivatives of **2** (Scheme 3). The relevance of these alkyl-carbonate derivatives (**14-22**) was the modification of their chemical properties (lipophilicity) or their biological properties, with respect to hydroxytyrosol (**2**).

Scheme 3. Synthesis of the alkyl-carbonate derivatives of hydroxytyrosol.



The synthesis of dibenzyl hydroxytyrosol chloroformate (**13**, 81%) with diphosgene (DP) and *N,N*-dimethylaniline (DMA) was performed in an inert atmosphere. The comparison of the ¹H NMR spectra of **8** and **13** showed, in the latter, two more deshielded triplet signals at δ_{H} 2.93 (H-7) and at δ_{H} 4.43 (H-8). The main difference of the ¹³C NMR spectra of **8** and **13** was the presence, in the latter, of a signal of a new carbon atom at δ_{C} 150.7 (C-1'), corresponding to the chloroformate group.

The dibenzyl-hydroxytyrosol-alkyl-carbonate array (**14-21**) was performed through compound **13**, with a carbonate linker, with diverse linear primary alcohols. The dimeric compound **22** was synthesized by coupling the chloroformate derivative (**13**) and the dibenzylated hydroxytyrosol (**8**). For these reactions, a solution of *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), and the appropriate alcohol, in toluene, was added in an inert atmosphere to a solution of compound **13** in toluene, with yields between 69% and 84%. The ¹H NMR spectra of compounds **14-21** showed a signal of the methyl group of the end of the alkylic chain at δ_{H} 0.9, except for compound **14** (δ_{H} 1.3), due to its proximity to the carbonate group, and also for **18**, because this compound has a double bond at this position (δ_{H} 4.97-5.05). The ¹H NMR spectra of compounds **15-21** also showed multiplet signals (between δ_{H} 1.2-1.7) due to the methylene groups of the middle of the chain, and a triplet signal at δ_{H} 4.1 corresponding to the methylene group (H-2') adjacent to the carbonate linker. The ¹³C NMR spectra of compounds **14-22** showed a signal of an oxygenated methylene carbon (C-2') around 68 ppm, and a signal of a carbonate carbon at around 155 ppm.

The hydroxytyrosol-alkyl-carbonate array (**23-31**) was achieved by catalytic hydrogenation of the corresponding dibenzylated derivatives (**14-22**). The protecting benzyl groups were removed by treating each dibenzylated derivative (**14-22**) in EtOH, with H₂ and Pd-C as catalyst, with yields above 85% (Scheme 3).

In general, phenolic compounds exhibit a high antioxidant activity, playing an important role in the chemical, nutritional, and organoleptic properties of food. Hydroxytyrosol (**2**) is a well-known phenol that has noteworthy antioxidant properties. This antioxidant activity can be influenced by changes into its chemical structure due to the presence of different chemical groups.

The potential antioxidant activities of the dibenzyl hydroxytyrosol (**8**), several dibenzyl hydroxytyrosol-alkyl-carbonate derivatives (**15**, **17**, and **18**), two dimeric derivatives of **2** (**22** and **31**), and all the hydroxytyrosol-alkyl-carbonate derivatives (**23-30**), were evaluated by different methods, and compared with **2** and also with well-known antioxidants such as BHT and α -tocopherol. Three methods were used to determine this antioxidant activity: FRAP and ABTS assays, to test the antioxidant power in hydrophilic media, and the Rancimat test to evaluate the antioxidant capacity in a lipophilic matrix.

The reducing capacities of the compounds **8**, **15**, **17**, **18**, **22-31**, in comparison with its precursor (**2**), and two commonly used antioxidants (BHT and α -tocopherol), were determined by the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assay (Table 1). These results showed that the alkyl-carbonate derivatives (**23-30**) of **2** exhibited a ferric reducing power significantly higher than its natural precursor (**2**), and also higher than BHT and α -tocopherol. This higher antioxidant activity has also been exhibited by other ester or ether derivatives of hydroxytyrosol.^{21,25} However, the dibenzyl derivatives tested (**8**, **15**, **17**, and **18**) and the dimeric derivatives (**22** and **31**) exhibited lower ferric reducing power than BHT, and only in compounds **15**, **17**, and **22**, were the reducing capacities higher than those of its precursor (**2**) and α -tocopherol.

The ABTS assay is a method widely used for measuring radical scavenging activity of antioxidants. In this assay, the scavenging of the stable free radical 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) was evaluated. The radical-scavenging activities of **2**, **8**, **15**, **17**, **18**, **22-31**, and BHT and α -tocopherol are shown in Table 1. These results show that the alkyl-carbonate derivatives **23-30** displayed higher activities with an increase in the length of their side chain. Thus, derivatives with a longer side chain (**25-30**) exhibited higher radical-scavenging activities than did the three standard compounds (**2**, BHT, and α -tocopherol). In contrast, compounds **23** and **24**, with a shorter side chain, exhibited lower antioxidant activities than did α -tocopherol, but higher than **2** and BHT. On the other hand, the dimeric derivatives (**22** and **31**) presented higher or similar antioxidant properties than did the three standard compounds. Finally, the dibenzyl derivatives (**8**, **15**, **17**, and **18**) showed lower radical-scavenging activities than did most of the standard compounds.

Table 1. Reducing Antioxidant Power Evaluated by the FRAP Assay and Radical-scavenging Capacity Evaluated by the ABTS Assay of several Hydroxytyrosol (**2**) Derivatives^a

compound	FRAP TEAC (mM) ^b	ABTS TEAC (mM) ^b
2	0.87 ± 0.02g	0.49 ± 0.01i
8	0.64 ± 0.01h	0.19 ± 0.00k
15	1.11 ± 0.08f	0.50 ± 0.04i
17	1.00 ± 0.01f	0.03 ± 0.00m
18	0.07 ± 0.01k	0.08 ± 0.00l
22	1.05 ± 0.01f	1.19 ± 0.01c
23	1.63 ± 0.06cd	0.80 ± 0.01h
24	1.31 ± 0.05e	0.85 ± 0.00g
25	1.81 ± 0.02ab	1.07 ± 0.01e
26	1.87 ± 0.11a	1.06 ± 0.00e
27	1.57 ± 0.02d	1.12 ± 0.01d
28	1.73 ± 0.02bc	1.21 ± 0.00c
29	1.84 ± 0.02ab	1.30 ± 0.00b
30	1.81 ± 0.05ab	1.41 ± 0.00a
31	0.46 ± 0.02i	0.97 ± 0.01f
BHT	1.29 ± 0.05e	0.28 ± 0.00j
α-tocopherol	0.87 ± 0.03g	0.98 ± 0.01f

^a Each value is the mean of triplicate measurements ± standard deviations. All values within a column with different letters are significantly different, according to Fisher LSD test at a $p < 0.05$ level of probability.

^b Results are expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) in units of mmol Trolox/L.

The results of the FRAP and ABTS assays showed that generally, when the phenolic groups were blocked with benzyl groups, the antioxidant activities were lower than when these groups were free. For this reason, the Rancimat test was not performed with these benzylated derivatives.

The antioxidant activities in food of the alkyl-carbonate derivatives **23-31** were evaluated by the oxidative stability in a commercial sunflower-oil matrix, using the Rancimat method. Aliquots of the sunflower-oil matrices were spiked with ascending concentrations (0.3-2.0 mM) of **2**, the alkyl-carbonate derivatives (**23-31**), BHT, and α-tocopherol, and subjected to accelerated oxidation with an air flow (15 L/h) bubbled successively through the matrices and heated at 98 °C. The antioxidant activity was called induction time (IT) and expressed in h (Figure 1). The alkyl-carbonate derivatives (**23-31**) showed higher antioxidant activities than did the standard products: **2**, BHT, and α-tocopherol. Although there was no clear influence of the size of side chain, the best results were achieved by the compounds with a longer chain (hexyl, octyl, decyl, dodecyl, tetradecyl, or hexadecyl) on the primary hydroxy group of **2**. However, the dimeric derivative (**31**) and the compounds with shorter chains (ethyl, butyl) exhibited antioxidant capacities similar to those of the standard compounds. On the other hand,

the induction time of all compounds tested was unaffected by the concentration of the matrix when its value was higher than 1.0 mM.

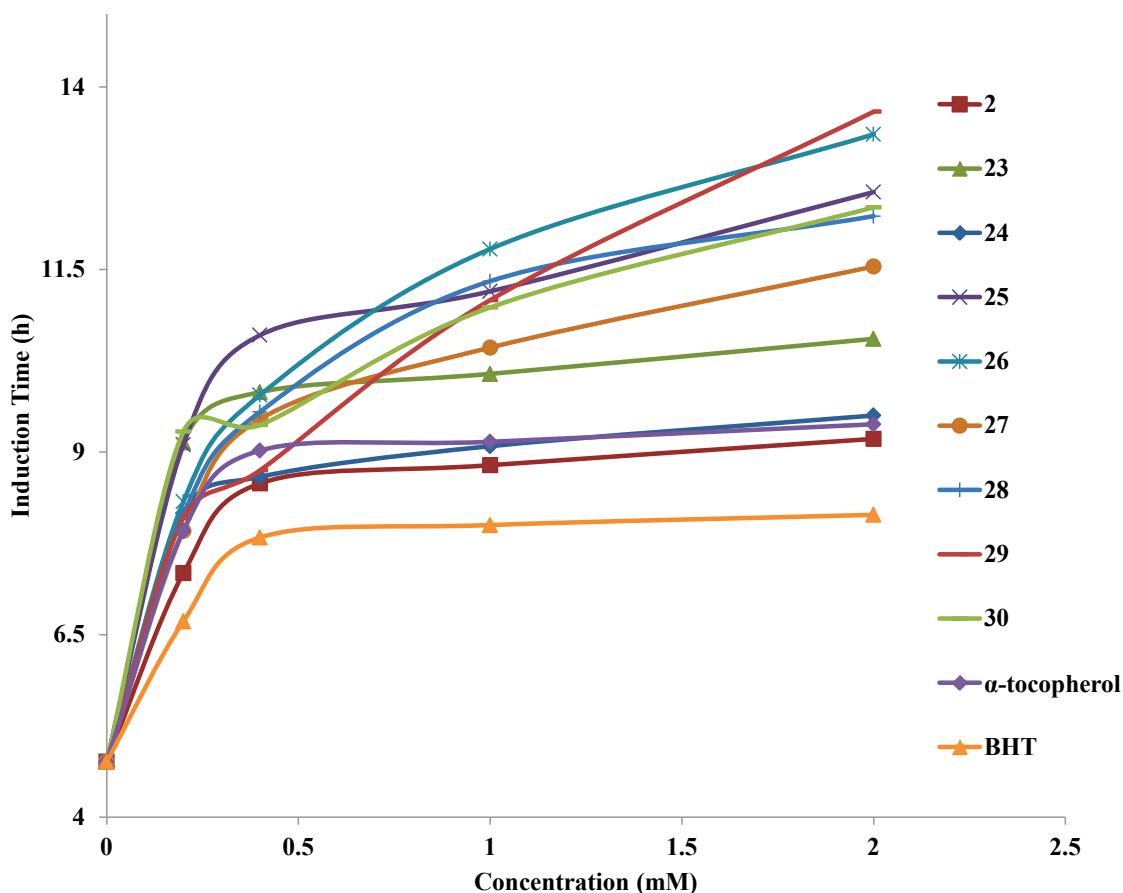


Figure 1. Induction times (IT) of lipid matrices spiked with the alkyl-carbonate derivatives (**23-30**), free hydroxytyrosol (**2**), and the antioxidant substances BHT and α -tocopherol.

In conclusion, the alkyl-carbonate derivatives (**23-30**) of hydroxytyrosol (**2**) increased the antioxidant activity of the parent compound (**2**), with these antioxidant properties also being higher than those of the commercial antioxidants BHT and α -tocopherol. The presence of the *ortho*-diphenolic structure in these compounds (**23-30**) was clearly decisive for their antioxidant activity, and was improved by the presence of the alkyl-carbonate groups. On the other hand, for all the methods used to determine the antioxidant activity, there was no clear influence of the side-chain length on the antioxidant properties of the alkyl-carbonate derivatives (**23-30**), although the best results were achieved mainly by the compounds with a longer chain (hexyl, octyl, decyl, dodecyl, tetradecyl, or hexadecyl) on the primary hydroxy group of **2**. Finally, these results show that these new lipophilic derivatives of **2**, with potent antioxidant properties, can play an important role in the food industry. The addition of phenolic antioxidants would be a useful strategy for the development of new functional foods,

because they would improve the nutritional properties and lengthen the shelf life of these products.

5.3 EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. IR spectra were recorded on a Mattson Satellite FTIR spectrometer. NMR spectra were recorded on a Varian Inova unity (300 MHz ^1H NMR), and a Varian direct drive (400, 500, and 600 MHz ^1H NMR) dissolving the samples in CDCl_3 . The ^{13}C NMR chemical shifts were assigned with the aid of distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) using a flip angle of 135° . High-resolution mass spectra were run using a Waters LCT Premier XE mass spectrometer or by the LSIMS (FAB) ionization mode in a Micromass Autospec-Q mass spectrometer (EBE geometry). For TLC, Merck silica gel 60 aluminum sheets were used, and the spots were visualized by spraying with $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-AcOH}$ or $\text{FeCl}_3\text{-H}_2\text{O}$. All solvents and reagents were of analytical grade from different sources: CH_2Cl_2 (Fisher, ref. D/1852/17), *n*-hexane (Merck, ref. 1.04374), Me_2CO (Fisher, ref. A/0600/17), MeOH (Fisher, ref. M/4000/17), and EtOAc (Fisher, ref. E/0900/17). 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT), α -tocopherol, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (97%, Trolox), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (98%, ABTS), and 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (98%, TPTZ), were all obtained from Sigma (Steinheim, Germany). *Candida antarctica* lipase (CAL) was generously supplied from Novo-Nordisk Bioindustrial S.A. (Madrid, Spain).

Plant Material. A specimen of the plant of *Olea europaea* (order Lamiales, family Oleaceae) was collected in Almegíjar, Granada, Spain in May 2001. This plant was identified by Laura Baena from the herbarium of the University of Granada. A voucher specimen (53489-1-1) was deposited at the University of Granada Herbarium (GDA), Granada, Spain.

General Tyrosol and Hydroxytyrosol Isolation Procedures. The phenolic extract was obtained from solid olive-mill-waste, called in Spanish “alperujo”.¹³ The solid wastes of olive-oil production were dried and extracted with ethyl acetate. The organic layer was concentrated until precipitation of the solid triterpene acids, and then the mixture was filtered to remove them. The concentrated organic layer was then extracted with water, and the aqueous layer was neutralized with sodium hydrogen carbonate. This aqueous layer was again extracted four times with ethyl acetate, which was dried with anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness, resulting a syrupy residue containing high portions of tyrosol (**1**) and hydroxytyrosol (**2**), and other minor impurities. The analysis of this residue by HPLC showed a composition of about 82% hydroxytyrosol (**2**), some 10% tyrosol (**1**), and a remaining 8% of other phenolic substances (Supporting Information). The chromatographic separation of this syrup mixture was very difficult due to the high polarity of its phenolic compounds. A better isolation of tyrosol (**1**) and hydroxytyrosol (**2**) was achieved when this syrup starting

material was previously acetylated (method 1), benzylated (method 2), or carbonated (method 3). In this sense, an isolation method for these phenolic compounds has been recently developed, using a high-performance countercurrent chromatography system (HPCCC), in normal- or reverse-phase mode, although it is more difficult to carry out on an industrial scale.³¹

Isolation by Chemical Acetylation (method 1a). Ac₂O-Py (10 mL), in a proportion of 2:1, was added to the phenolic extract (1 g). The reaction was stirred for 1 h at reflux, and kept 12 h more at room temperature. The mixture was diluted with acid water to pH 7, and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated to dryness. The resulting residue was purified by column chromatography using silica gel as a solid support, yielding separately the completely acetylated compounds **3** and **4**.³² Subsequently, 500 mg of each compound (**3** and **4**) were dissolved in dry THF (5 mL), and 1 mL of a 1 M solution of LiAlH₄ in THF was added to each solution. Both reaction mixtures were stirred for 2 h at reflux, and kept 12 h more at room temperature. Then, the reaction mixtures were washed separately with water and extracted repeatedly with CH₂Cl₂. The organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated to dryness. The resulting residues were purified, giving the respective phenolic compounds **1** (8% of overall yield) and **2** (68% of overall yield).

Isolation by Enzymatic Acetylation (method 1b). A solution (20 mL) of ethyl acetate/vinyl acetate (1:1), containing 1 g of *Candida antarctica* lipase, was added to 1 g of the same previous phenolic extract. The reaction was stirred with orbital shaking at 40 °C for 24 h. The reaction mixture was filtered and evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography, rendering the monoacetyl derivatives **5** and **6**.²¹ Both compounds were then separated and purified by column chromatography, and afterwards the acetyl group was removed from each monoacetyl derivative. Thus, a solution (5 mL) of H₂O-ethyl acetate (5:1), containing 100 mg of *Candida antarctica* lipase, was added to 50 mg of each compound (**5** and **6**). The reactions were stirred with orbital shaking at 40 °C for 24 h. Each reaction mixture was filtered and evaporated under reduced pressure, and each residue was purified by column chromatography, producing, respectively, compounds **1** (9% of overall yield) and **2** (72% of overall yield).

Isolation by Benzylation (method 2). The benzylation reaction was performed by dissolving 1 g of the phenolic extract in 10 mL of dry acetone. To this solution, 3 g of K₂CO₃ and 1.5 mL of BnCl (d = 1.1 g/mL) were added. The reaction mixture was stirred for 4 h at 55 °C, and then was filtered, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ and washed with a solution of NaHCO₃. The organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated to dryness. The resulting residue was purified by column chromatography, isolating the benzylated derivatives **7** (9%) and **8** (72%).^{29,33} The benzyl groups were removed by catalytic hydrogenation. Thus, 300 mg of each compound (**7** and **8**) were dissolved, respectively, in 20 mL of EtOH and a catalytic amount of Pd-C was added.

The solution was placed in a hydrogenation reactor at 5 atm of H₂ pressure for 24 h. Then, the solution was filtered and the organic layer concentrated under reduced pressure. The residue was chromatographed, yielding compounds **1** and **2** almost quantitatively.

Isolation by Carbomethoxylation (method 3) and subsequent Carbonylation (method 3a) or Acetonation (method 3b). Dimethyl carbonate (DMC, 11.1 mmol, 10 mL) and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU, 6.5 mmol, 1 mL) were added to 1 g of the phenolic extract. The reaction was stirred for 8 h at reflux, and then the solvent was evaporated at reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, and the organic layer was washed with a solution of 1 N HCl, dried with anhydrous Na₂SO₄, and concentrated at reduced pressure.³⁰ From the resulting residue, the derivatives **9** and **10** were separated with some difficulty. For this reason, a portion of this mixture of compounds (**9** and **10**) was subjected to a carbonylation reaction. Thus, carbonyldiimidazole (CDI, 3.1 mmol, 500 mg) was added to 500 mg of this mixture (**9** and **10**) in toluene (20 mL), and the reaction mixture was stirred for 2 h at reflux. Then, this reaction mixture was concentrated to dryness and the resulting residue was chromatographically purified, rendering compounds **9** (8%) and **11** (64%). The protecting groups of both compounds were removed by treatment with LiAlH₄, under the same conditions described above for compounds **3** and **4**, giving, respectively, the phenolic compounds **1** (7% of overall yield) and **2** (57% of overall yield).

Compound 11: syrup; IR (film) ν_{\max} 1823, 1747, 1442, 1280, 1259, 1233 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400.45 MHz) δ 7.16 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6), 7.14 (1H, brs, H-3), 7.09 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 4.34 (2H, t, J = 6.6 Hz, H-8), 3.76 (3H, s, CH₃-O), 3.01 (2H, t, J = 6.6 Hz, H-7); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.70 MHz) δ 155.7 (C, C=O), 151.4 (C, C=O), 143.5 (C, C-2), 142.2 (C, C-1), 135.1 (C, C-4), 125.4 (CH, C-5), 111.1 (CH, C-3), 110.4 (CH, C-6), 68.0 (CH₂, C-8), 55.0 (CH₃, CH₃-O), 35.2 (CH₂, C-7); HRESIMS m/z 261.0168 (calcd for C₁₁H₁₀O₆Na, 261.0375).

Another portion of the same mixture (**9** and **10**) was subjected to an acetonation reaction. Thus, 2,2-dimethoxypropane (DMP, 41 mmol, 5 mL) and *p*-toluensulfonic acid (pTSA, 0.1 mmol, 20 mg) were added to 500 mg of this mixture (**9** and **10**) in dry acetone (20 mL), and was stirred for 3 h at reflux. Then, the reaction mixture was concentrated to dryness and the resulting residue was purified, yielding compounds **9** (9%) and **12** (75%).³⁴ The protecting group of compound **9** was again removed by treatment with LiAlH₄, giving tyrosol (**1**, 8% of overall yield). The protecting groups of compound **12** were removed by treatment with LiAlH₄, under the same conditions described above for compounds **3** and **4**, and subsequent treatment with a solution of 2 M HCl (10 mL) at 50 °C for 5 h. Then, the reaction mixture was extracted with EtOAc, and the organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄, and concentrated at reduced pressure, giving hydroxytyrosol (**1**, 60% of overall yield).

Synthesis Procedures.

Synthesis of Dibenzyl Hydroxytyrosol Chloroformate (13). Diposgene (1 mmol, 120 μL) and *N,N*-dimethylaniline (1 mmol, 125 μL) were slowly added (10 min) to a solution of the dibenzylated derivative **8** (1 mmol, 334 mg) in THF (10 mL), at 0 °C in an argon atmosphere.³⁵ The reaction mixture was stirred 3 h at room temperature. Then, diethyl ether was added to the reaction mixture until complete precipitation. This mixture was then filtered and washed with water. The organic layer was dried with anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and evaporated to dryness. The resulting residue was purified by chromatography to give compound **13** (81%).

Compound 13: syrup; IR (film) ν_{max} 1770, 1511, 1454, 1259 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400.45 MHz) δ 7.46–7.30 (10H, m, aromatic H), 6.89 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.81 (1H, brs, H-3), 6.73 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 5.14 and 5.10 (each 2H, collapsed AB systems, Ph- CH_2 -O), 4.43 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-8), 2.93 (2H, t, $J = 7$ Hz, H-7); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.70 MHz) δ 150.7 (C, C=O), 149.2 (C, C-2), 148.3 (C, C-1), 137.3 and 137.4 (2 aromatic C), 130.1 (C, C-4), 128.6, 128.0, 127.9, 127.5, 127.4 (10 aromatic CH), 122.0 (CH, C-5), 116.2 (CH, C-3), 115.3 (CH, C-6), 72.4 (CH_2 , C-8), 71.6 and 71.5 (2 Ph- CH_2 -O), 34.4 (CH_2 , C-7); HRESIMS m/z 396.1135 (calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{ClNa}$, 396.1128).

General Method for the Synthesis of the Hydroxytyrosol Alkyl-carbonate Derivatives. To a solution containing DIPEA (1.7 mmol, 310 μL), DMAP (0.65 mmol, 81 mg), and the respective alcohol (EtOH, butan-1-ol, hexan-1-ol, octan-1-ol, dec-9-en-1-ol, dodecan-1-ol, tetradecan-1-ol, hexadecane-1-ol, or dibenzylated **2**; 1.2–1.4 mmol), in toluene (5 mL) at 0 °C in an argon atmosphere, a second solution of compound **13** (1 mmol, 396 mg), also in toluene (5 mL), was added. The reaction mixture was stirred for 15 min at 0 °C, and then maintained for 12 h at room temperature. Next, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography to give the products (**14–22**).

Compound 14. According to the general procedure, **13** (396 mg) reacted with EtOH (80 μL) to give **14** (341 mg, 84%). Syrup; IR (film) ν_{max} 2925, 1761, 1250 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400.45 MHz) δ 7.46–7.26 (10H, m, aromatic H), 6.87 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.83 (1H, brs, H-3), 6.74 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 5.15 and 5.14 (each 2H, collapsed AB systems, Ph- CH_2 -O), 4.26 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-8), 4.18 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-1'), 2.88 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-7), 1.30 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.70 MHz) δ 155.3 (C, C=O), 149.2 (C, C-2), 148.0 (C, C-1), 137.6 and 137.4 (2 aromatic C), 130.8 (C, C-4), 128.7, 127.9, 127.6 and 127.5 (10 aromatic CH), 122.0 (CH, C-5), 116.3 (CH, C-3), 115.6 (CH, C-6), 71.6 and 71.5 (2 Ph- CH_2 -O), 68.4 (CH_2 , C-8), 64.1 (CH_2 , C-1'), 34.8 (CH_2 , C-7), 14.4 (CH_3 , C-2'); HRESIMS m/z 407.1862 (calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_5$, 407.1858).

Compound 15. According to the general procedure, **13** (396 mg) reacted with butan-1-ol (118 μL) to give **15** (344 mg, 79%). Syrup; IR (film) ν_{max} 1739, 1511, 1248 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400.45 MHz) δ 7.45–7.36 (10H, m, aromatic H), 6.89 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.76 (1H, brs, H-3), 6.75 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 5.15 and 5.14 (each

2H, collapsed AB systems, Ph-CH₂-O), 4.27 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-8), 4.14 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 2.89 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-7), 1.66-1.41 (4H, m, H-2' and H-3'), 0.95 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, H-4'); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.70 MHz) δ 155.4 (C, C=O), 149.1 (C, C-2), 148.0 (C, C-1), 137.5 and 137.4 (2 aromatic C), 130.8 (C, C-4), 127.9, 127.8, 127.5 and 127.4 (10 aromatic CH), 122.0 (CH, C-5), 116.2 (CH, C-3), 115.6 (CH, C-6), 71.6 and 71.5 (2 Ph-CH₂-O), 68.4 (CH₂, C-8), 68.0 (CH₂, C-1'), 34.8 (CH₂, C-7), 30.8 (CH₂, C-2'), 19.0 (CH₂, C-3'), 13.8 (CH₃, C-4'); HRESIMS m/z 457.1983 (calcd for C₂₇H₃₀O₅Na, 457.1991).

Compound 16. According to the general procedure, **13** (396 mg) reacted with hexan-1-ol (180 μ L) to give **16** (356 mg, 77%). Syrup; IR (film) ν_{\max} 1741, 1511, 1250 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400.45 MHz) δ 7.46–7.30 (10H, m, aromatic H), 6.87 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.83 (1H, brs, H-3), 6.74 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 5.14 and 5.13 (each 2H, collapsed AB systems, Ph-CH₂-O), 4.26 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-8), 4.11 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 2.88 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7), 1.66 (2H, m, H-2'), 1.31 (6H, m, H-3', H-4' and H-5'), 0.89 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-6'); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.70 MHz) δ 155.4 (C, C=O), 149.2 (C, C-2), 148.0 (C, C-1), 137.6 and 137.4 (2 aromatic C), 130.8 (C, C-4), 128.6, 127.9, 127.5 and 127.4 (10 aromatic CH), 122.0 (CH, C-5), 116.2 (CH, C-3), 115.6 (CH, C-6), 71.5 and 71.4 (2 Ph-CH₂-O), 68.2 (CH₂, C-8), 68.1 (CH₂, C-1'), 34.6 (CH₂, C-7), 31.4 (CH₂, C-4'), 28.6 (CH₂, C-2'), 25.3 (CH₂, C-3'), 22.5 (CH₂, C-5'), 14.0 (CH₃, C-6'); HRESIMS m/z 485.2301 (calcd for C₂₉H₃₄O₅Na, 485.2304).

Compound 17. According to the general procedure, **13** (396 mg) reacted with octan-1-ol (220 μ L) to give **17** (380 mg, 77%). Syrup; IR (film) ν_{\max} 2825, 1740, 1511, 1250 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400.45 MHz) δ 7.47–7.31 (10H, m, aromatic H), 6.91 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.85 (1H, brs, H-3), 6.74 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 5.15 and 5.14 (each 2H, collapsed AB systems, Ph-CH₂-O), 4.27 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-8), 4.13 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 2.89 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-7), 1.29 (12H, m, H-2'–H-7'), 0.95 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, H-8'); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.70 MHz) δ 155.4 (C, C=O), 149.1 (C, C-2), 148.0 (C, C-1), 137.5 and 137.4 (2 aromatic C), 130.1 (C, C-4), 128.6, 127.9, 127.8, 127.5 and 127.4 (10 aromatic CH), 122.0 (CH, C-5), 116.1 (CH, C-3), 115.1 (CH, C-6), 71.6 and 71.5 (2 Ph-CH₂-O), 68.3 (CH₂, C-1'), 68.2 (CH₂, C-8), 34.8 (CH₂, C-7), 31.9 (CH₂, C-6'), 29.3, 29.2 and 28.8 (each CH₂, C-2', C-4', and C-5'), 25.8 (CH₂, C-3'), 22.8 (CH₂, C-7'), 14.4 (CH₃, C-8'); HRESIMS m/z 513.2624 (calcd for C₃₁H₃₈O₅Na, 513.2617).

Compound 18. According to the general procedure, **13** (396 mg) reacted with dec-9-en-1-ol (260 μ L) to give **18** (360 mg, 69%). Syrup; IR (film) ν_{\max} 2924, 1741, 1251 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400.45 MHz) δ 7.47–7.30 (10H, m, aromatic H), 6.88 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.84 (1H, brs, H-3), 6.74 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 5.15 and 5.14 (each 2H, collapsed AB systems, Ph-CH₂-O), 5.05–4.97 (3H, m, H-9' and H-10'), 4.27 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-8), 4.12 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 2.89 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-7), 2.04 (2H, m, H-8'), 1.66 (2H, q, $J = 6.5$ Hz, H-2'), 1.40–1.30 (10H, m, H-3'–H-7'); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.70 MHz) δ 155.4 (C, C=O), 149.1 (C, C-2), 148.0 (C, C-1),

139.3 (CH, C-9'), 137.5 and 137.4 (2 aromatic C), 130.1 (C, C-4), 128.6, 127.9, 127.8, 127.6 and 127.4 (10 aromatic CH), 122.0 (CH, C-5), 116.1 (CH, C-3), 115.1 (CH, C-6), 114.3 (CH₂, C-10'), 71.6 and 71.5 (2 Ph-CH₂-O), 68.3 (CH₂, C-1'), 68.2 (CH₂, C-8), 34.8 (CH₂, C-7), 33.9 (CH₂, C-8') 29.5, 29.3, 29.1, 29.0 and 28.8 (each CH₂, C-2', C4'-C-7'), 25.8 (CH₂, C-3'); HRESIMS *m/z* 539.2759 (calcd for C₃₃H₄₀O₅Na, 539.2773).

Compound 19. According to the general procedure, **13** (396 mg) reacted with dodecan-1-ol (240 mg) to give **19** (445 mg, 81%). Syrup; IR (film) ν_{\max} 2920, 1743, 1253 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400.45 MHz) δ 7.46–7.29 (10H, m, aromatic H), 6.87 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 6.83 (1H, brs, H-3), 6.74 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 5.14 and 5.13 (each 2H, collapsed AB systems, Ph-CH₂-O), 4.26 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-8), 4.12 (2H, t, *J* = 6.8 Hz, H-1'), 2.88 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-7), 1.65 (2H, m, H-2'), 1.26 (18H, m, H-3'-H-11'), 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-12'); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.70 MHz) δ 155.4 (C, C=O), 149.2 (C, C-2), 148.0 (C, C-1), 137.6 and 137.4 (2 aromatic C), 130.8 (C, C-4), 128.6, 127.9, 127.8, 127.5 and 127.4 (10 aromatic CH), 122.0 (CH, C-5), 116.2 (CH, C-3), 115.5 (CH, C-6), 71.6 and 71.5 (2 Ph-CH₂-O), 68.4 (CH₂, C-8), 68.3 (CH₂, C-1'), 34.8 (CH₂, C-7), 32.1 (CH₂, C-10'), 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4 and 28.8 (each CH₂, C-2', C-4'-C-9'), 25.8 (CH₂, C-3'), 22.8 (CH₂, C-11'), 14.3 (CH₃, C-12'); HRESIMS *m/z* 569.3247 (calcd for C₃₅H₄₆O₅Na, 569.3243).

Compound 20. According to the general procedure, **13** (396 mg) reacted with tetradecan-1-ol (278 mg) to give **20** (438 mg, 76%). Syrup; IR (film) ν_{\max} 2922, 2825, 1742, 1253 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400.45 MHz) δ 7.46–7.29 (10H, m, aromatic H), 6.87 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-6), 6.83 (1H, brs, H-3), 6.74 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5), 5.14 and 5.13 (each 2H, collapsed AB systems, Ph-CH₂-O), 4.26 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-8), 4.11 (2H, t, *J* = 6.8 Hz, H-1'), 2.89 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-7), 1.65 (2H, m, H-2'), 1.26 (22H, m, H-3'-H-13'), 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-14'); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.70 MHz) δ 155.4 (C, C=O), 149.2 (C, C-2), 148.0 (C, C-1), 137.6 and 137.4 (2 aromatic C), 130.8 (C, C-4), 128.6, 127.9, 127.8, 127.5 and 127.4 (10 aromatic CH), 122.0 (CH, C-5), 116.2 (CH, C-3), 115.5 (CH, C-6), 71.6 and 71.5 (2 Ph-CH₂-O), 68.4 (CH₂, C-8), 68.3 (CH₂, C-1'), 34.8 (CH₂, C-7), 32.1 (CH₂, C-12'), 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4 and 28.8 (each CH₂, C-2', C-4'-C-11'), 25.8 (CH₂, C-3'), 22.8 (CH₂, C-13'), 14.3 (CH₃, C-14'); HRESIMS *m/z* 597.3535 (calcd for C₃₇H₅₀O₅Na, 597.3556).

Compound 21. According to the general procedure, **13** (396 mg) reacted with hexadecan-1-ol (314 mg) to give **21** (498 mg, 82%). Syrup; IR (film) ν_{\max} 2917, 2850, 1740, 1251 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400.45 MHz) δ 7.46–7.30 (10H, m, aromatic H), 6.89 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 6.84 (1H, brs, H-3), 6.74 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 5.14 and 5.13 (each 2H, collapsed AB systems, Ph-CH₂-O), 4.26 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, H-8), 4.11 (2H, t, *J* = 6.8 Hz, H-1'), 2.88 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, H-7), 1.66 (2H, m, H-2'), 1.26 (26H, m, H-3'-H-15'), 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-16'); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.70 MHz) δ 155.6 (C, C=O), 149.2 (C, C-2), 148.0 (C, C-1), 137.5 and 137.4 (2 aromatic C), 130.8 (C, C-4), 128.6, 127.9, 127.8, 127.5 and 127.4 (10 aromatic CH), 122.0 (CH, C-5), 116.2 (CH, C-3), 115.5 (CH, C-6), 71.6 and 71.5 (2 Ph-CH₂-O), 68.4 (CH₂, C-8),

68.3 (CH₂, C-1'), 34.8 (CH₂, C-7), 32.1 (CH₂, C-14'), 31.1 (CH₂, C-2'), 29.9, 29.9, 29.8, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4 and 28.8 (each CH₂, C-4'-C-13'), 25.8 (CH₂, C-3'), 22.8 (CH₂, C-15'), 14.3 (CH₃, C-16'); HRESIMS *m/z* 625.3872 (calcd for C₃₉H₅₄O₅Na, 625.3869).

Compound 22. According to the general procedure, **13** (396 mg) reacted with **8** (468 mg) to give **22** (520 mg, 83%). Syrup; IR (film) ν_{\max} 1599, 1510, 1253, 1222 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400.45 MHz) δ 7.46–7.30 (20H, m, aromatic H), 6.87 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 6.83 (2H, brs, H-3), 6.74 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 5.14 and 5.13 (each 2H, 4 collapsed AB systems, Ph-CH₂-O), 4.26 (4H, t, *J* = 6.0 Hz, H-8), 2.87 (4H, t, *J* = 6.0 Hz, H-7); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.70 MHz) δ 155.2 (C, C=O), 149.1 (C, C-2), 148.0 (C, C-1), 137.5 and 137.4 (4 aromatic C), 130.7 (C, C-4), 128.4, 127.9, 127.8, 127.6 and 127.4 (20 aromatic CH), 122.0 (CH, C-5), 116.2 (CH, C-3), 115.1 (CH, C-6), 71.6 and 71.5 (4 Ph-CH₂-O), 68.5 (CH₂, C-8), 34.8 (CH₂, C-7); HRESIMS *m/z* 717.2839 (calcd for C₄₅H₄₂O₇Na, 717.2828).

General Method for Debenzylation. A solution of the corresponding dibenzylated compound (**14-22**), in EtOH, was reduced with Pd-C under H₂ atmosphere, under the same conditions described above for compounds **7** and **8**, yielding, respectively, compounds **23-31**.

Compound 23. According to the general procedure, **14** (0.5 mmol, 200 mg) was reduced with H₂ to give **23** (100 mg, 88%). Syrup; IR (film) ν_{\max} 3390, 1715, 1228 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400.45 MHz) δ 6.79 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 6.74 (1H, brs, H-3), 6.65 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 4.28 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-8), 4.19 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, H-1'), 2.86 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-7), 1.30 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2'); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.70 MHz) δ 155.4 (C, C=O), 143.7 (C, C-2), 142.5 (C, C-1), 130.3 (C, C-4), 121.6 (CH, C-5), 116.1 (CH, C-3), 115.6 (CH, C-6), 68.6 (CH₂, C-8), 64.3 (CH₂, C-1'), 34.6 (CH₂, C-7), 14.4 (CH₃, C-2'); HRESIMS *m/z* 249.0737 (calcd for C₁₁H₁₄O₅Na, 249.0739).

Compound 24. According to the general procedure, **15** (0.46 mmol, 200 mg) was reduced with H₂ to give **24** (105 mg, 89%). Syrup; IR (film) ν_{\max} 3408, 1715, 1275 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400.45 MHz) δ 6.79 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 6.73 (1H, brs, H-3), 6.64 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 4.28 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-8), 4.19 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-1'), 2.86 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-7), 1.64 (2H, quint, *J* = 7.2 Hz, H-2'), 1.39 (2H, sext, *J* = 7.2 Hz, H-3'), 0.93 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-4'); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.70 MHz) δ 155.6 (C, C=O), 143.7 (C, C-2), 142.5 (C, C-1), 130.3 (C, C-4), 121.5 (CH, C-5), 116.1 (CH, C-3), 115.6 (CH, C-6), 68.6 (CH₂, C-8), 68.2 (CH₂, C-1'), 34.6 (CH₂, C-7), 30.8 (CH₂, C-2'), 19.0 (CH₂, C-3'), 13.8 (CH₃, C-4'); HRESIMS *m/z* 277.1049 (calcd for C₁₃H₁₈O₅Na, 277.1052).

Compound 25. According to the general procedure, **16** (0.43 mmol, 200 mg) was reduced with H₂ to give **25** (111 mg, 91%). Syrup; IR (film) ν_{\max} 3402, 1715, 1249 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 499.79 MHz) δ 6.79 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6), 6.75 (1H, brs, H-3),

6.65 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 4.28 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-8), 4.11 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 2.86 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7), 1.68-1.62 (2H, m, H-2'), 1.38-1.26 (6H, m, H-3', H-4', and H-5'), 0.89 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, H-6'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.68 MHz) δ 155.5 (C, C=O), 143.7 (C, C-2), 142.4 (C, C-1), 130.4 (C, C-4), 121.6 (CH, C-5), 116.2 (CH, C-3), 115.6 (CH, C-6), 68.5 (CH_2 , C-8), 68.4 (CH_2 , C-1'), 34.6 (CH_2 , C-7), 31.5 (CH_2 , C-4'), 28.8 (CH_2 , C-2'), 25.5 (CH_2 , C-3'), 22.7 (CH_2 , C-5'), 14.1 (CH_3 , C-6'); HRESIMS m/z 305.1364 (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{Na}$, 305.1365).

Compound 26. According to the general procedure, **17** (0.41 mmol, 200 mg) was reduced with H_2 to give **26** (114 mg, 89%). Syrup; IR (film) ν_{max} 3392, 2925, 1720, 1250 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 499.79 MHz) δ 6.79 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.75 (1H, brs, H-3), 6.65 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 4.27 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-8), 4.11 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 2.86 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-7), 1.65 (2H, m, H-2'), 1.35-1.25 (10H, m, H-3'-H-7'), 0.88 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, H-8'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.68 MHz) δ 155.5 (C, C=O), 143.7 (C, C-2), 142.4 (C, C-1), 130.5 (C, C-4), 121.6 (CH, C-5), 116.1 (CH, C-3), 115.6 (CH, C-6), 68.5 (CH_2 , C-8), 68.4 (CH_2 , C-1'), 34.6 (CH_2 , C-7), 31.9 (CH_2 , C-6'), 29.3, 29.2 and 28.8 (each CH_2 , C-2', C-4', and C-5'), 25.8 (CH_2 , C-3'), 22.8 (CH_2 , C-7'), 14.1 (CH_3 , C-8'); HRESIMS m/z 333.1674 (calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_5\text{Na}$, 333.1678).

Compound 27. According to the general procedure, **18** (0.39 mmol, 200 mg) was reduced with H_2 to give **27** (117 mg, 89%). Syrup; IR (film) ν_{max} 3410, 2923, 1718, 1249 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 499.79 MHz) δ 6.79 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.74 (1H, brs, H-3), 6.65 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 4.27 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-8), 4.11 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 2.86 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-7), 1.65 (2H, quint, $J = 6.5$ Hz, H-2'), 1.40-1.22 (14H, m, H-3'-H-9'), 0.88 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, H-10'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.68 MHz) δ 155.5 (C, C=O), 143.7 (C, C-2), 142.4 (C, C-1), 130.4 (C, C-4), 121.6 (CH, C-5), 116.1 (CH, C-3), 115.6 (CH, C-6), 68.5 (CH_2 , C-8), 68.4 (CH_2 , C-1'), 34.6 (CH_2 , C-7), 32.0 (CH_2 , C-8'), 29.7, 29.6, 29.4, 29.3 and 28.8 (each CH_2 , C-2', C-4'-C-7'), 25.8 (CH_2 , C-3'), 22.8 (CH_2 , C-9'), 14.3 (CH_3 , C-10'); HRESIMS m/z 361.1991 (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{Na}$, 361.1991).

Compound 28. According to the general procedure, **19** (0.37 mmol, 200 mg) was reduced with H_2 to give **28** (121 mg, 89%). Syrup; IR (film) ν_{max} 3405, 2923, 1718, 1280 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 600.24 MHz) δ 6.79 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.75 (1H, brs, H-3), 6.66 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 4.27 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-8), 4.11 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 2.86 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-7), 1.65 (2H, quint, $J = 6.5$ Hz, H-2'), 1.36-1.26 (18H, m, H-3'-H-11'), 0.88 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, H-12'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150.95 MHz) δ 155.5 (C, C=O), 143.7 (C, C-2), 142.4 (C, C-1), 130.5 (C, C-4), 121.6 (CH, C-5), 116.1 (CH, C-3), 115.6 (CH, C-6), 68.5 (CH_2 , C-8), 68.4 (CH_2 , C-1'), 34.6 (CH_2 , C-7), 32.1 (CH_2 , C-10'), 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4 and 28.8 (each CH_2 , C-2', C-4'-C-9'), 25.8 (CH_2 , C-3'), 22.8 (CH_2 , C-11'), 14.3 (CH_3 , C-12'); HRESIMS m/z 389.2306 (calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{Na}$, 389.2304).

Compound 29. According to the general procedure, **20** (0.35 mmol, 200 mg) was reduced with H_2 to give **29** (109 mg, 78%). Syrup; IR (film) ν_{max} 3408, 2916, 1740,

1260 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 499.79 MHz) δ 6.79 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.75 (1H, brs, H-3), 6.66 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 4.27 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-8), 4.11 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 2.86 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-7), 1.65 (2H, quint, $J = 6.5$ Hz, H-2'), 1.35-1.25 (22H, m, H-3'-H-13'), 0.88 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, H-14'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.68 MHz) δ 155.6 (C, C=O), 143.7 (C, C-2), 142.4 (C, C-1), 130.5 (C, C-4), 121.6 (CH, C-5), 116.2 (CH, C-3), 115.6 (CH, C-6), 68.5 (CH_2 , C-8), 68.4 (CH_2 , C-1'), 34.6 (CH_2 , C-7), 32.1 (CH_2 , C-12'), 29.9, 29.9, 29.8, 29.8, 29.7, 29.7, 29.5, 29.4 and 28.8 (each CH_2 , C-2', C-4'-C-11'), 25.9 (CH_2 , C-3'), 22.9 (CH_2 , C-13'), 14.3 (CH_3 , C-14'); HRESIMS m/z 417.2614 (calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{O}_5\text{Na}$, 417.2617).

Compound 30. According to the general procedure, **21** (0.32 mmol, 200 mg) was reduced with H_2 to give **30** (130 mg, 96%). Syrup; IR (film) ν_{max} 3387, 2917, 1741, 1262 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 499.79 MHz) δ 6.79 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.74 (1H, brs, H-3), 6.66 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 4.27 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-8), 4.11 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-1'), 2.86 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-7), 1.65 (2H, quint, $J = 7.0$ Hz, H-2'), 1.35-1.25 (26H, m, H-3'-H-15'), 0.88 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-16'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.68 MHz) δ 155.5 (C, C=O), 143.7 (C, C-2), 142.4 (C, C-1), 130.4 (C, C-4), 121.6 (CH, C-5), 116.2 (CH, C-3), 115.6 (CH, C-6), 68.5 (CH_2 , C-8), 68.4 (CH_2 , C-1'), 34.7 (CH_2 , C-7), 32.1 (CH_2 , C-14'), 29.9, 29.9, 29.9, 29.8, 29.8, 29.8, 29.7, 29.7, 29.5, 29.4 and 28.8 (each CH_2 , C-2', C-4'-C-13'), 25.9 (CH_2 , C-3'), 22.9 (CH_2 , C-15'), 14.3 (CH_3 , C-16'); HRESIMS m/z 445.2939 (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{Na}$, 445.2930).

Compound 31. According to the general procedure, **22** (0.43 mmol, 300 mg) was reduced with H_2 to give **31** (140 mg, 97%). Syrup; IR (film) ν_{max} 3399, 1716, 1276, 1247 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 499.79 MHz) δ 6.71 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 6.65 (2H, brs, H-3), 6.52 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 4.20 (4H, t, $J = 7.0$ Hz, H-8), 2.77 (4H, t, $J = 7.0$ Hz, H-7); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125.68 MHz) δ 155.3 (C, C=O), 144.3 (C, C-2), 143.2 (C, C-1), 129.3 (C, C-4), 120.7 (CH, C-5), 115.8 (CH, C-3), 115.2 (CH, C-6), 68.7 (CH_2 , C-8), 34.5 (CH_2 , C-7); HRESIMS m/z 357.0944 (calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_7\text{Na}$, 357.0950).

Antioxidant Activity.

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay. The FRAP assay was performed according to a procedure described,³⁶ with some modifications.³⁷ The antioxidant potential of the derivatives of **2** was estimated from their capacity to reduce the ferric tripyridyltriazine complex (TPTZ-Fe(III)) to its stable ferrous form (TPTZ-Fe(II) complex). Each value is the mean of triplicate measurements (UV-vis spectrophotometer Varian Cary 50 BIO), and the results are expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC, mM).

ABTS Assay. The free-radical scavenging capacity was measured using the ABTS decoloration method (UV-vis spectrophotometer Varian Cary 50 BIO), with some modifications.³⁸ This method is based on the ability of different components to scavenge the ABTS radical cation ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) compared to a standard antioxidant

(Trolox). The results are expressed in mM TE (Trolox equivalent). Each value is the average of three determinations.

Evaluation of Oxidative Stability by the Rancimat Method. The oxidative stability of the derivatives of **2** was evaluated by an accelerated automated test using a Rancimat equipment (Model 743, Metrohm Co., Basel, Switzerland).²⁵ Aliquots of the glyceridic matrix were spiked with increasing amounts of the hydroxytyrosol derivatives (**23-31**), free hydroxytyrosol (**2**), as well as α -tocopherol and BHT, ranging from 0.3 to 2.0 mM (the maximum concentration to reach a steady state of oxidative stability), and then subjected to accelerated oxidation in a Rancimat apparatus at 98 °C. The results are expressed as induction time (IT) in h, corresponding to the stability of the lipid matrix evaluated. All determinations were carried out in duplicate.

Statistical Analysis. All data are presented as the means \pm standard deviation from the independent experiments made in triplicates. The data were evaluated by one-way ANOVA with the Statistix 8 program for Windows, and the differences between means were assessed using the Fisher LSD (least significant difference) test. Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

HPLC protocol for analyzing the composition of the phenolic extract, HPLC chromatogram of the phenolic extract composition (Figure S1), ¹³C NMR spectrum of the phenolic extract (Figure S2), and ¹H NMR, ¹³C NMR and DEPT spectra of **2** (Figures S3, S4, and S5). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

* Tel.: +34 958 240480. Fax: +34 958 248437. E-mail: aparra@ugr.es (A. P.)

* Tel./Fax: +34 958 240479. E-mail: frivas@ugr.es (F. R.)

ACKNOWLEDGMENTS

A. Fernandez-Hernandez deeply appreciates the contract grant funded by the Agricultural Research Institute of Spain (INIA) and the European Social Fund. This work was also financially supported by grants from the ‘Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa’ of the ‘Junta de Andalucía’ (P11FQM-7372). We thank David Nesbitt for reviewing the English in the manuscript.

5.4 REFERENCES

- (1) Martin-Pelaez, S.; Covas, M. I.; Fito, M.; Kusar, A.; Pravst, I. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 760–771.
- (2) Tripoli, E.; Giammanco, M.; Tabacchi, G.; Di Majo, D.; Giammanco, S.; La Guardia, M. *Nutr. Res. Rev.* **2005**, *18*, 98–112.
- (3) Haraguchi, T.; Kayashima, T.; Okazaki, Y.; Inoue, J.; Mineo, S.; Matsubara, K.; Sakaguchi, E.; Yanaka, N.; Kato, N. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 5589–5594.
- (4) Aparicio-Soto, M.; Sanchez-Fidalgo, S.; Gonzalez-Benjumea, A.; Maya, I.; Fernandez-Bolaños, J. G.; Alarcon-de-la-Lastra, C. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 836–846.
- (5) Mateos, R.; Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Dominguez, V.; Cert, M. R.; Parrado, J.; Sarria, B.; Bravo, L.; Espartero, J. L. *Food Chem.* **2015**, *173*, 313–320.
- (6) Goya, L.; Mateos, R.; Bravo, L. *Eur. J. Nutr.* **2007**, *46*, 70–78.
- (7) Rodríguez-Morató, J.; Xicota, L.; Fitó, M.; Farré, M.; Dierssen, M.; De la Torre, R. *Molecules* **2015**, *20*, 4655–4680.
- (8) Hu, T.; He, X. W.; Jiang, J. G.; Xu, X. L. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 1449–1455.
- (9) Bulotta, S.; Celano, M.; Lepore, S. M.; Montalcini, T.; Pujia, A.; Russo, D. *J. Transl. Med.* **2014**, *12*, 219.
- (10) Bernini, R.; Merendino, N.; Romani, A.; Velotti, F. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 655–670.
- (11) Visioli, F.; Bernardini, E. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 786–804.
- (12) Fernandez-Bolaños, J. G.; Lopez, O.; Fernandez-Bolaños, J.; Rodriguez-Gutierrez, G. *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 442–463.
- (13) Garcia-Granados, A.; Parra, A. Int. Pat. WO2007093659, 2007.
- (14) Gikas, E.; Papadopoulos, N.; Tsiropoulos, A. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **2006**, *29*, 497–508.
- (15) Yuan, J. J.; Wang, C. Z.; Ye, J. Z.; Tao, R.; Zhang, Y. S. *Molecules* **2015**, *20*, 2903–2921.
- (16) Kaki, S. S.; Gopal, S. C.; Rao, B. V. S. K.; Poornachandra, Y.; Kumar, C. G.; Prasad, R. B. N. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2013**, *115*, 1123–1129.
- (17) Laszlo, J. A.; Cermak, S. C.; Evans, K. O.; Compton, D. L.; Evangelista, R.; Berhow, M. A. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2013**, *115*, 363–371.

- (18) Burattini, S.; Salucci, S.; Baldassarri, V.; Accorsi, A.; Piatti, E.; Madrona, A.; Espartero, J. L.; Candiracci, M.; Zappia, G.; Falcieri, E. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *55*, 248–256.
- (19) Lucas, R.; Comelles, F.; Alcántara, D.; Maldonado, O. S.; Curaizone, M.; Parra, J. L.; Morales, J. C. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8021–8026.
- (20) Tofani, D.; Balducci, V.; Gasperi, T.; Incerpi, S.; Gambacorta, A. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5292–5299.
- (21) Mateos, R.; Trujillo, M.; Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Cert, A.; Espartero, J. L. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10960–10966.
- (22) Bernini, R.; Gilardini-Montani, M. S.; Merendino, N.; Romani, A.; Velotti, F. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9089–9107.
- (23) Trujillo, M.; Gallardo, E.; Madrona, A.; Bravo, L.; Sarria, B.; Gonzalez-Correa, J. A.; Mateos, R.; Espartero, J. L. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 10297–10303.
- (24) Pereira-Caro, G.; Bravo, L.; Madrona, A.; Espartero, J. L.; Mateos, R. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 798–806.
- (25) Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Bravo, L.; Espartero, J. L.; Alcudia, F.; Cert, A.; Bernini, R. *Food Chem.* **2009**, *115*, 86–91.
- (26) Chillemi, R.; Sciuto, S.; Spatafora, C.; Tringali, C. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*; Preedy, V. R.; Watson, R. R., Eds.; Elsevier: London, 2010; pp 1233–1243.
- (27) Bernini, R.; Mincione, E.; Barontini, M.; Crisante, F. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8897–8904.
- (28) Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Bravo, L.; Mateos, R.; Espartero, J. L. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1169–1178.
- (29) Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Mateos, R.; Rodriguez, G.; Trujillo, M.; Fernandez-Bolaños, J.; Espartero, J. L. *Molecules* **2009**, *14*, 1762–1772.
- (30) Bernini, R.; Mincione, E.; Crisante, F.; Barontini, M.; Fabrizi, G.; Gentili, P. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7000–7003.
- (31) Adhami, H. R.; Zehl, M.; Dangl, C.; Dorfmeister, D.; Stadler, M.; Urban, E.; Hewitson, P.; Ignatova, S.; Krenn, L. *Food Chem.* **2015**, *170*, 154–159.
- (32) Capasso, R.; Evidente, A.; Avolio, S.; Solla, F. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1745–1748.
- (33) Vlachogianni, I. C.; Fragopoulou, E.; Kostakis, I. K.; Antonopoulou, S. *Food Chem.* **2015**, *177*, 165–173.

- (34) Bernini, R.; Crisante, F.; Merendino, N.; Molinari, R.; Soldatelli, M. C.; Velotti, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 439–446.
- (35) Su, W.; Zhong, W.; Bian, G.; Shi, X.; Zhang, J. *Org. Prep. Proced. Int.* **2004**, *36*, 499–547.
- (36) Benzie, I. F.; Strain, J. J. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76.
- (37) Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3396–3402.
- (38) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237.

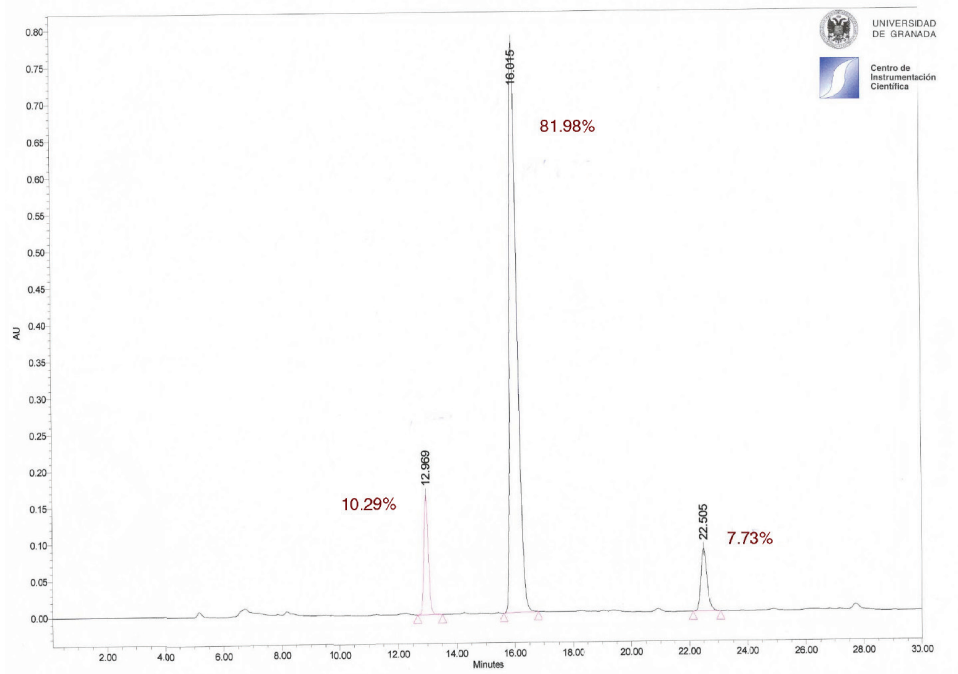
5.5 SUPPORTING INFORMATION

HPLC protocol for analyzing the composition of the phenolic extract.

HPLC study of the phenolic extract composition was carried out with a Waters C18 phase column (0.4 μm diameter of particle; 150 mm x 3.9 mm) with a flow rate of 1 mL/min, on a Waters Liquid Chromatograph (HPLC), model Alliance 2690 (Waters, USA). Wavelength of 279 nm was selected for the detection of compounds. The analysis was performed using the following gradient:

Min 0	100% A
Min 15	95% A – 5% B
Min 16	75% A – 25% B
Min 22	75% A – 25% B
Min 23	100% A
Min 30	100% B

Solvent A is H_2O containing 0.1% TFA, and solvent B is CH_3CN containing 0.1% TFA.



Retention times: Compound 1, 12.962 min; Compound 2, 16.015 min.

Figure S1: HPLC chromatogram of the phenolic extract composition.

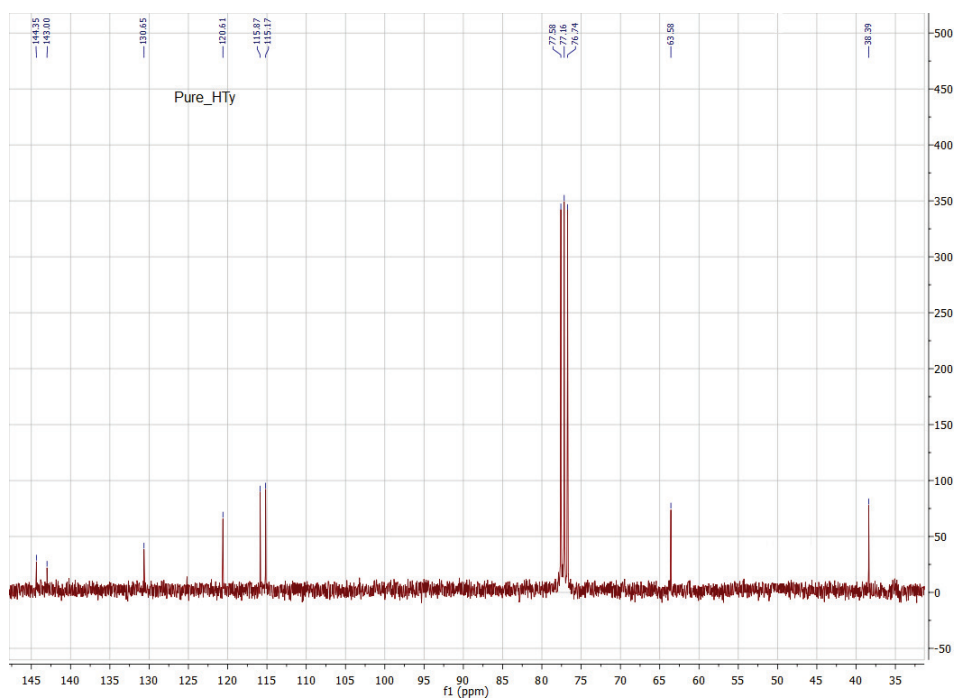


Figure S4: ^{13}C NMR spectrum of **2** (CDCl_3 , 100.70 MHz).

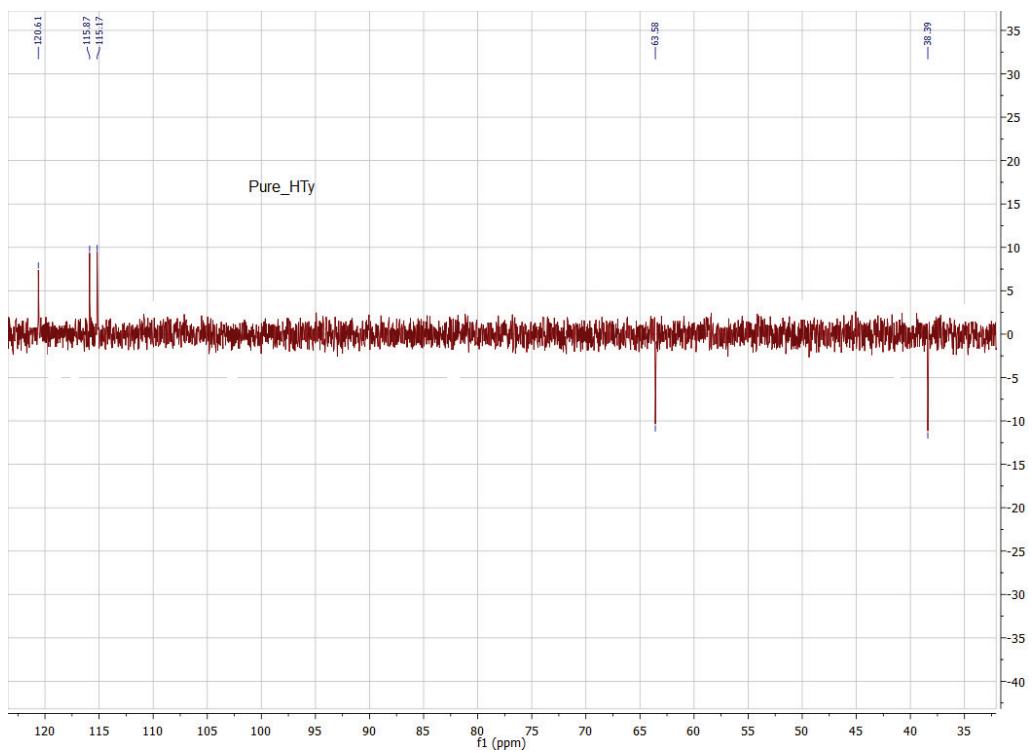


Figure S5: DEPT spectrum of **2** (CDCl_3 , 100.70 MHz).

Publicación 4

Journal of Natural Products 2018, In Press.

JCR 2017: 3.885. Q1

JOURNAL OF
NATURAL
PRODUCTS

Cite This: *J. Nat. Prod.* XXXX, XXX, XXX–XXX

Article


pubs.acs.org/jnp

Semisynthesis of ω -Hydroxyalkylcarbonate Derivatives of Hydroxytyrosol as Antitrypanosome Agents

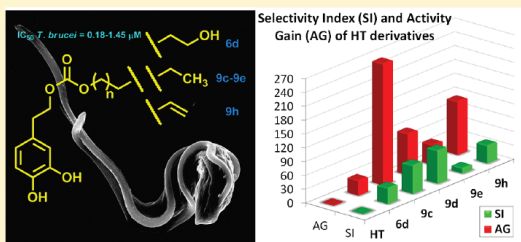
Ignacio Fernandez-Pastor,^{†,§} Marta Martínez-García,^{‡,§} Marta Medina-O'Donnell,[†] Francisco Rivas,^{*,†} Antonio Martínez,[†] José María Pérez-Victoria,^{*,‡} and Andrés Parra^{*,†}

[†]Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Fuentenueva, s/n, E-18071 Granada, Spain

[‡]Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra", CSIC (IPBLN-CSIC), PTS Granada, Avenida del Conocimiento, 17, 18016, Armilla, Granada, Spain

 Supporting Information

ABSTRACT: Several lipophilic ω -hydroxyalkylcarbonate hydroxytyrosol derivatives and also their corresponding dimeric derivatives have been synthesized, coupling the primary hydroxy group of this phenolic compound with several terminal diols of different chain lengths, by the use of a carbonate linker. The trypanocidal activity and cytotoxicity of these ω -hydroxyalkylcarbonate derivatives of hydroxytyrosol and known alkylcarbonate derivatives of hydroxytyrosol were assessed. Three of the hydroxytyrosol alkylcarbonate derivatives were active against *Trypanosoma brucei*: two with an alkyl chain of average size (0.2 and 0.5 μ M) and another with a double bond in the alkyl chain (0.4 μ M). These values suggest an increase in activity with respect to hydroxytyrosol (264-, 90-, and 116-fold, respectively). Furthermore, these compounds showed high selectivity indices against MRC-5, a nontumor human cell line (62, 71, and 39, respectively). Some other ω -hydroxyalkylcarbonate and alkylcarbonate derivatives of hydroxytyrosol were also active against *T. brucei* within a low micromolar range (about 1 μ M).



Neglected tropical diseases (NTDs) form a group of infectious diseases that cause devastating illnesses for more than a billion people.¹ Among them is human African trypanosomiasis (HAT), or sleeping sickness, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma brucei* and transmitted by the tsetse fly (*Glossina* spp.), which threatens the lives of around 70 million people in more than 35 countries in sub-Saharan Africa.^{2,3} The first stage of the disease (hemolymphatic phase) is characterized by fever, headaches, and sickness. Then, the parasites cross the blood–brain barrier to enter the central nervous system (CNS), causing the second stage of the disease (neurological phase), characterized by poor coordination, general motor weaknesses, and disruption of the body's natural circadian sleep/wake rhythm, resulting in fragmented sleeping patterns that give the name to the disease.⁴ African trypanosomes are also responsible for “nagana” or African animal trypanosomiasis (AAT) in cattle. African trypanosomiasis (HAT and AAT) remains a serious obstacle to the health and development of African countries. This disease is fatal if left untreated, and the few approved treatments available are relatively toxic and have led to the emergence of drug resistance. This disease is one of the main reasons for poverty in sub-Saharan Africa, not only being the greatest health restriction to improved livestock production in this area but also exerting its impact on African agriculture, as it impedes the development of sustainable agricultural systems based on domesticated animals.^{5,6} *T. brucei* has a digenetic life

cycle, with a bloodstream form, which replicates in the mammalian host to cause the disease, and a procyclic form, which resides in the insect vector.

This disease is fatal if left untreated, and there are few approved treatments available. For the first stage of the disease, pentamidine and suramin are used against infections by *T. brucei gambiense* and *T. brucei rhodesiense*, respectively. For the second stage, eflornithine, alone or in combination with nifurtimox (NECT), is used against *T. brucei gambiense*, whereas melarsoprol is used against *T. brucei rhodesiense*.⁴ These drugs are relatively toxic (melarsoprol kills 5% of patients) and have led to the emergence of drug resistance. Moreover, these treatments are difficult to administer and thus lack full effectiveness in areas where HAT is endemic and where access to advanced medical care such as intravenous medication is limited. Therefore, there is an urgent need for new treatments.⁷

Polyphenols constitute a group of secondary metabolites present in a large number of woody and herbaceous plants. These compounds exhibit a wide range of biological and pharmacological activities such as anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, antitumor, and antiviral.^{8–12}

Hydroxytyrosol (HT) is a diphenolic compound present in a high percentage in olive oil and can be isolated from the mill

Received: May 29, 2018

Semisynthesis of ω -Hydroxyalkylcarbonate Derivatives of Hydroxytyrosol as Antitrypanosome Agents

Ignacio Fernandez-Pastor,^{†,§} Marta Martínez-García,^{‡,§} Marta Medina-O'Donnell,[†] Francisco Rivas,^{*,†} Antonio Martínez,[†] José María Pérez-Victoria,^{*,‡} and Andres Parra^{*,†}

[†] Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Fuentenueva, s/n, E-18071 Granada, Spain

[‡] Instituto de Parasitología y Biomedicina “Lopez-Neyra”, CSIC, (IPBLN-CSIC), PTS Granada, Avda. del Conocimiento, 17, 18016, Armilla, Granada, Spain

ABSTRACT: Several lipophilic ω -hydroxyalkylcarbonate hydroxytyrosol derivatives and also their corresponding dimeric derivatives have been synthesized, coupling the primary hydroxy group of this phenolic compound with several terminal diols of different chain lengths, by the use of a carbonate linker. The trypanocidal activity and cytotoxicity of these ω -hydroxyalkylcarbonate derivatives of hydroxytyrosol and known alkylcarbonate derivatives of hydroxytyrosol were assessed. Three of the hydroxytyrosol alkylcarbonate derivatives were active against *Trypanosoma brucei*: two with an alkyl chain of average size (0.2 and 0.5 μM) and another with a double bond in the alkyl chain (0.4 μM). These values suggest an increase in activity with respect to hydroxytyrosol (264-, 90-, and 116-fold, respectively). Furthermore, these compounds showed high selectivity indices against MRC-5, a non-tumor human cell line (62, 71, and 39, respectively). Some other ω -hydroxyalkylcarbonate and alkylcarbonate derivatives of hydroxytyrosol were also active against *T. brucei* within a low micromolar range (about 1 μM).

6.1 INTRODUCTION

Neglected tropical diseases (NTDs) form a group of infectious diseases that cause devastating illnesses for more than a billion people.¹ Among them is Human African Trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma brucei* and transmitted by the tsetse fly (*Glossina* spp.), which threatens the lives of around 70 million people in more than 35 countries in sub-Saharan Africa.^{2,3} The first stage of the disease (hemolymphatic phase) is characterized by fever, headaches, and sickness. Then, the parasites cross the blood-brain barrier to enter the central nervous system (CNS), causing the second stage of the disease (neurological phase), characterized by poor coordination, general motor weaknesses, and disruption of the body's natural circadian sleep/wake rhythm, resulting in fragmented sleeping patterns that give the name to the disease.⁴ African trypanosomes are also responsible for “nagana” or African animal trypanosomiasis (AAT) in cattle. African Trypanosomiasis (HAT and AAT) remains a serious obstacle to the health and development of African countries. This disease is fatal if left untreated, and the few approved treatments available are relatively toxic and have led to the emergence of drug resistance. This disease is one of the main reasons for poverty in sub-Saharan Africa, not only being the greatest health restriction to improved livestock production in this area, but also exerting its impact on African agriculture, as it impedes the development of sustainable agricultural systems based on domesticated animals.^{5,6} *Trypanosoma brucei* has a digenetic life cycle with a bloodstream form, which replicates in the mammalian host to cause the disease, and a procyclic form, which resides in the insect vector.

This disease is fatal if left untreated, and there are few approved treatments available. For the first stage of the disease, pentamidine and suramin are used against infections by *T. brucei gambiense* and *T. brucei rhodesiense*, respectively. For the second stage, eflornithine, alone or in combination with nifurtimox (NECT), is used against *T. brucei gambiense*, whereas melarsoprol is used against *T. brucei rhodesiense*.⁴ These drugs are relatively toxic (melarsoprol kills 5% of patients) and have led to the emergence of drug resistance. Moreover, these treatments are difficult to administer and thus lack full effectiveness in areas where the HAT is endemic and where access to advanced medical care such as intravenous medication is limited. Therefore, there is an urgent need for new treatments.⁷

Polyphenols constitute a group of secondary metabolites present in a large number of woody and herbaceous plants. These compounds exhibit a wide range of biological and pharmacological activities such as anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, antitumor, and antiviral.⁸⁻¹²

Hydroxytyrosol (HT) is a diphenolic compound present in a high percentage in olive oil, and can be isolated from the mill wastewater after the processing of this oil. This compound has recently attracted attention from numerous researchers because of its wide variety of biological properties and its potential health benefits, such as

neuroprotective, cardioprotective, anticancer, anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial effects.¹³⁻¹⁷

During the last few years, many HT derivatives and analogues have been synthesized. Having a more lipophilic character than HT, these compounds have exhibited greater bioavailability and improved affinity with the constituents of the lipophilic membranes.¹⁸ These lipophilic derivatives of HT are usually ethers,^{19,20} esters,²¹⁻²⁵ or carbonates,²⁶ with alkyl chains. Some of these lipophilic HT derivatives have also shown to be more effective than their precursor (HT), especially for their anti-inflammatory, antiproliferative, and antioxidant properties.^{27,28} Recently, the trypanocidal activity of several tyrosol and HT derivatives have been reported.²⁹

In this work, the semisynthesis of a series of ω -hydroxyalkylcarbonate derivatives of hydroxytyrosol, with different chain lengths, and also as their corresponding dimeric form were synthesized. The *in vitro* activity against *Trypanosoma brucei* bloodstream forms of these ω -hydroxyalkylcarbonate derivatives and other alkylcarbonate derivatives of HT previously produced has also been tested.

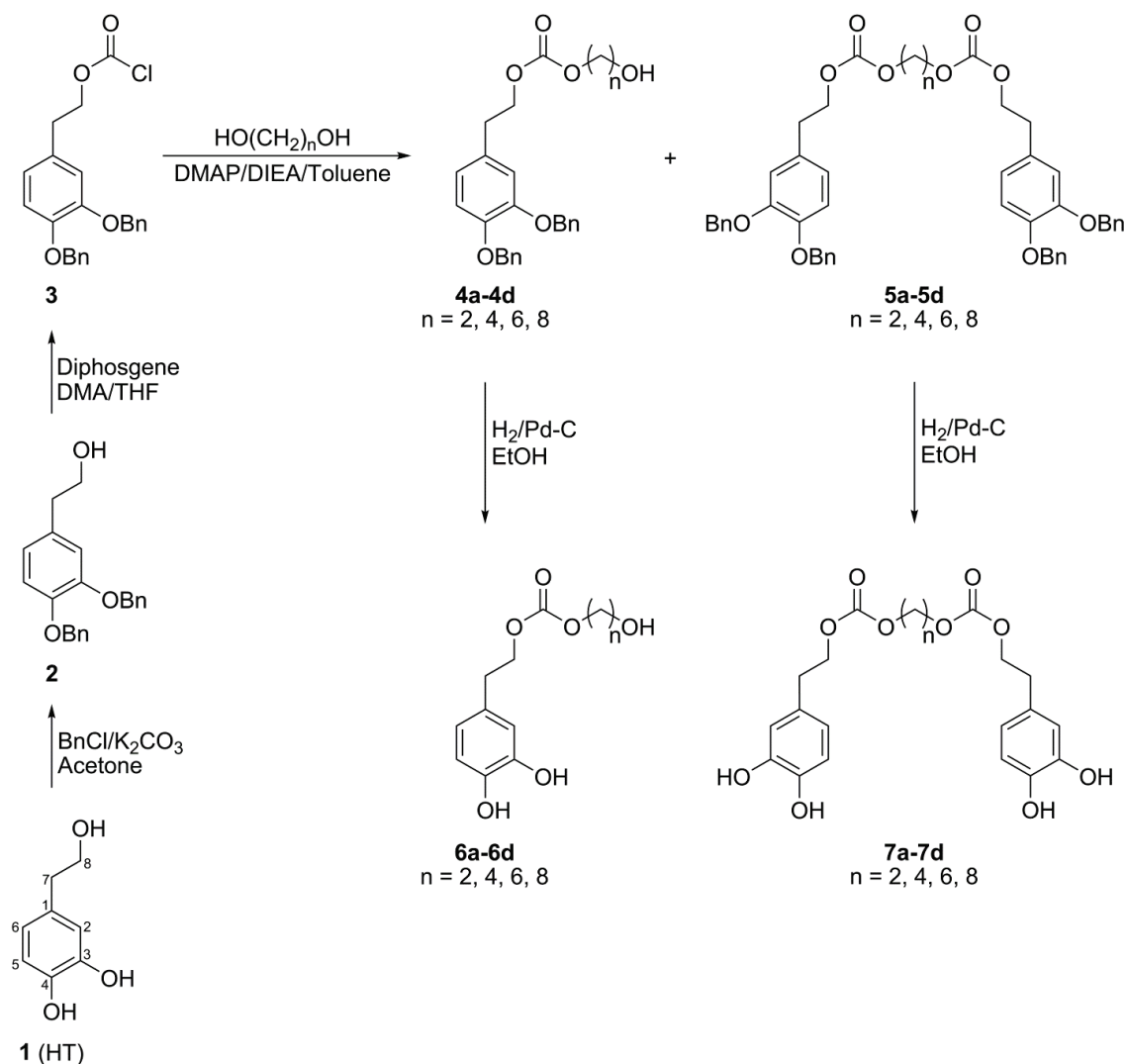
6.2 RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry. Hydroxytyrosol (**1**, HT) is a natural diphenolic compound, widely distributed in the plant kingdom, and is the starting material for the semi-synthesized derivatives in this report. HT (**1**) is present in considerable quantity in the mill wastes from the olive oil industry, being a hydrolysis product of oleuropein.³⁰

The sequence of formation of the ω -hydroxyalkylcarbonate derivatives of HT was performed as follows. First, the *ortho*-diphenolic groups of HT were protected, forming the dibenzylated derivative **2**. Secondly, the reaction of compound **2** with diphosgene led to the intermediate chloroformate **3**. Finally, the coupling reactions for the formation of the ω -hydroxyalkylcarbonate derivatives **4a-d** and also their dimeric forms **5a-d** were carried out through this chloroformate derivative **3** with several terminal diols of different chain lengths, in a basic medium (Scheme 1).

The treatment of the phenolic extract, taken from the solid olive-mill wastes, with benzyl chloride and K₂CO₃ in acetone, is a method to isolate and purify the HT contained in this extract. This optimized treatment yielded, among other benzylated compounds, the dibenzylated derivative (**2**, 72%).

Once the *ortho*-diphenolic groups were protected, the introduction of a chloroformate group on the primary hydroxy group of **2** was performed. Thus, compound **2** was treated with diphosgene (DP) and *N,N*-dimethylaniline (DMA) under an Ar atmosphere to afford the chloroformate derivative (**3**, 81%).²⁶

Scheme 1. Synthesis of the ω -hydroxyalkylcarbonate derivatives of hydroxytyrosol.

The coupling reactions of compound **3** with several terminal diols of different chain lengths (ethane-1,2-diol, butane-1,4-diol, hexane-1,6-diol, and octane-1,8-diol), produced the hydroxytyrosol ω -hydroxyalkylcarbonate derivatives **4a-d**, respectively, and also their corresponding dimeric derivatives **5a-d**. These reactions were carried out by dissolving *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), and the corresponding terminal diol in toluene. The four resulting solutions were added, respectively, under Ar atmosphere, to solutions of compound **3**, also in toluene, yielding the following pairs of compounds: **4a** (40%) and **5a** (32%), **4b** (42%) and **5b** (32%), **4c** (45%) and **5c** (35%), and **4d** (40%) and **5d** (30%).

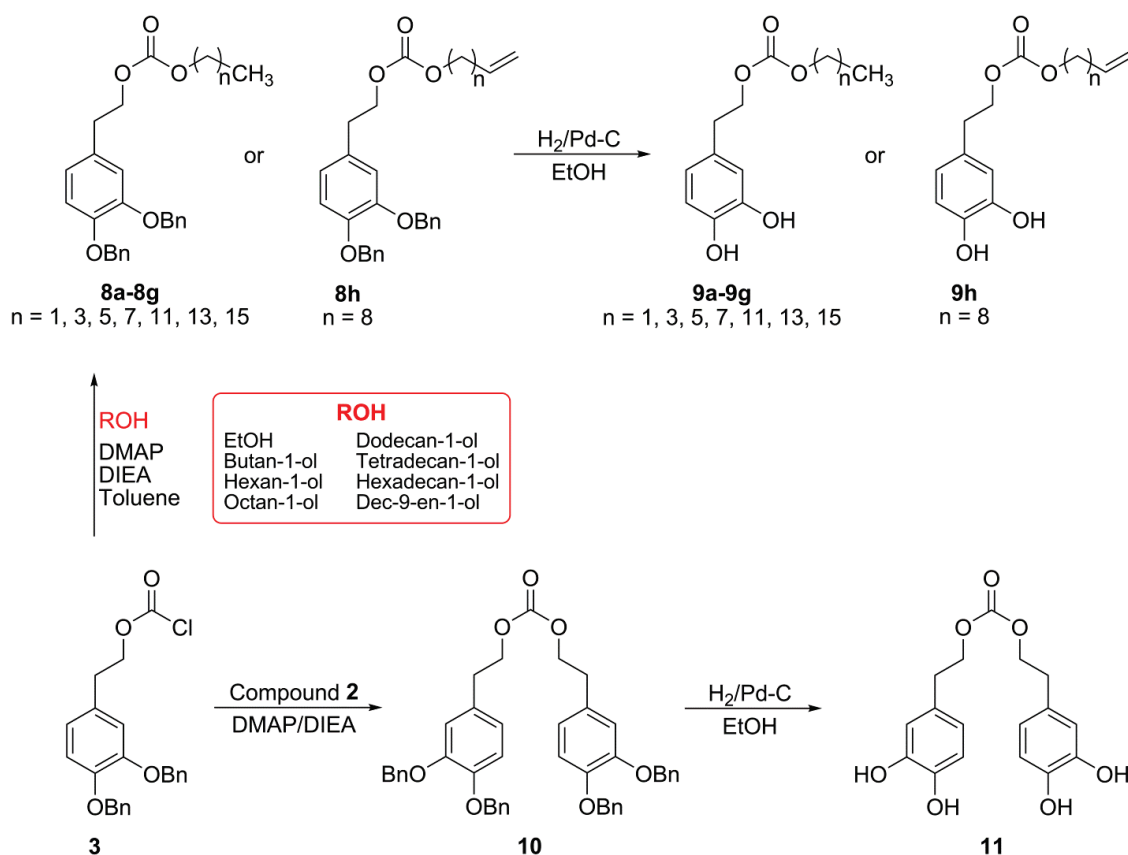
The percentages of the hydroxytyrosol ω -hydroxyalkylcarbonate derivatives **4a–d** and those of their corresponding dimers **5a–d**, can be regulated by the ratio of the intermediate chloroformate **3** and the corresponding terminal diol. These ω -hydroxyalkylcarbonate derivatives **4a–d** resulted predominantly when the molar ratio of the chloroformate derivative (**3**) and the corresponding terminal diol was 1:1. However, when an excess (3:1) of the intermediate chloroformate **3** was used against the corresponding terminal diol, the dimers **5a–d** were formed mainly by coupling two molecules of the HT derivative **3** with the hydroxy groups of the corresponding diol. For this reason, the coupling reactions were performed using a slight excess (2:1) of intermediate **3**, to produce monomers **4a–d** and the corresponding dimers **5a–d** in a more balanced ratio.

The ^1H NMR spectra of compounds **4a–d** and **5a–d**, compared to that of compound **3**, showed a new triplet resonance (δ_{H} 4.11–4.33), due to the methylene protons adjacent to the carbonate group. In addition, the ^1H NMR spectra of **4a–d** also showed resonances from the terminal hydroxymethyl group (δ_{H} 3.61–3.83). The ^{13}C NMR spectra of these compounds (**4a–d** and **5a–d**) showed carbonate carbon resonances (ca δ_{C} 155) and also methylene carbon (C-1') resonances (δ_{C} 65.3–69.4). The ^{13}C NMR spectra of **4a–d** showed resonances for the terminal hydroxymethyl carbon (δ_{C} 62.2–64.1).

The benzylated ω -hydroxyalkylcarbonate derivatives **4a–d** and **5a–d** were deprotected by catalytic hydrogenation, respectively yielding derivatives **6a–d** and **7a–d**. The NMR data of the debenzylated derivatives **6a–d** and **7a–d** were similar to those of derivatives **4a–d** and **5a–d**, respectively, but for the resonances of the benzyl groups.

The coupling reactions of the chloroformate derivative **3** with primary alcohols with different chain lengths resulted in a set of hydroxytyrosol alkylcarbonate derivatives **8a–h** (Scheme 2).²⁶ Deprotection of the benzylated derivatives **8a–h** by catalytic hydrogenation afforded derivatives **9a–h**.²⁶ Similarly, when the chloroformate derivative **3** was coupled with the dibenzylated derivative **2**, a dimeric compound (**10**) resulted. Catalytic hydrogenation of **10** led to the formation of compound **11**.²⁶

Scheme 2. Synthesis of the alkylcarbonate derivatives of hydroxytyrosol.



Biological Activity. The trypanocidal activity and cytotoxicity of the set of hydroxytyrosol ω -hydroxyalkylcarbonate derivatives **4a-d**, **5a-d**, **6a-d**, and **7a-d** and several hydroxytyrosol alkylcarbonate derivatives (**8c**, **8e**, **9a-h**, **10**, and **11**) were evaluated in vitro against *T. brucei* bloodstream forms to calculate the IC_{50} (50% inhibition of parasite growth). The cytotoxicity of the compounds that showed an IC_{50} value of less than 5 μM was also evaluated against MRC-5, a non-tumor human lung fibroblast cell line widely used as a control for drug toxicity.^{29,31,32} The selectivity indices (SI) were calculated with the formula: $\text{IC}_{50}(\text{MRC-5}) / \text{IC}_{50} T. brucei$. The activity gain (AG) of each compound with respect to HT (**1**) was calculated according to the formula: $\text{IC}_{50}(\text{HT}) / \text{IC}_{50} \text{ compound}$.

Table 1 shows the antiparasitic and cytotoxic data for HT (**1**) and its ω -hydroxyalkylcarbonate derivatives **4a-d**, **5a-d**, **6a-d**, and **7a-d**. Some of the structural modifications significantly increased the activity. The IC_{50} values against *T. brucei* varied from 1 to 10 μM , for most of the derivatives, and the IC_{50} values against the non-tumor lung cell line (MRC-5) were consistently higher than 50 μM , which indicated a low cytotoxicity. The increase in activity gain (AG) of the derivatives with respect to HT (**1**) was between 5- and almost 50-fold. In general, the benzylated derivatives **4a-d**

and **5a–d** were slightly less active against *T. brucei* than their corresponding debenzylated derivatives **6a–d** and **7a–d**. In addition, only slight differences were detected between the activity of each monomeric compound **4a–d** and **6a–d** and those of its respective dimeric derivative **5a–d** and **7a–d**. Remarkably, the hydroxytyrosol 8-hydroxyoctylcarbonate (**6d**) and its dimeric derivative **7d** displayed the lowest IC₅₀ values (1.5 and 1.0 μM, respectively), and a spike in activity with respect to HT (**1**) (AG values of 33 and 48, respectively). These compounds have the longest alkyl chain and the *ortho*-diphenolic groups are not protected.

Table 1. Trypanocidal Activity and Cytotoxicity of the HT ω-Hydroxyalkylcarbonate Derivatives^a

Type of compound	Compound #	n	<i>T. brucei</i> IC ₅₀ (μM)	MRC-5 IC ₅₀ (μM)	SI	AG
Precursor	HT (1)		47.5 ± 16.9 ^b	> 50 ^b	> 1	1.0
Benzylated monomers	4a	2	9.4 ± 0.3	ND		5.0
	4b	4	> 10	ND		
	4c	6	4.1 ± 0.2	> 50	> 12	11.6
	4d	8	5.7 ± 0.7	ND		8.3
Benzylated dimers	5a	2	5.7 ± 0.7	ND		8.4
	5b	4	> 10	ND		
	5c	6	8.1 ± 0.5	ND		5.9
	5d	8	6.2 ± 0.5	ND		7.7
Debenzylated monomers	6a	2	6.4 ± 0.5	ND		7.4
	6b	4	> 10	ND		
	6c	6	4.1 ± 0.2	> 50	> 12	11.6
	6d	8	1.5 ± 0.2	> 50	> 35	32.8
Debenzylated dimers	7a	2	3.8 ± 0.2	> 50	> 13	12.6
	7b	4	4.0 ± 0.2	> 50	> 13	12.0
	7c	6	2.1 ± 0.1	> 50	> 24	22.6
	7d	8	1.0 ± 0.0	> 50	> 50	47.5

^an = number of methylene groups (CH₂) of the alkyl chain; SI = selectivity Index (IC₅₀ MRC-5 / IC₅₀ *T. brucei*); AG = activity gain (IC₅₀ HT (**1**) / IC₅₀ compound); ND = not determined. ^bFrom reference.²⁹

Table 2 displays the antiparasitic and cytotoxic data for HT (**1**) and several hydroxytyrosol alkylcarbonate derivatives **8c**, **8e**, **9a–h**, **10**, and **11**. The HT derivatives in which the *ortho*-diphenolic groups were benzylated **8c**, **8e**, and **10** showed IC₅₀ values against *T. brucei* above 10 μM. In contrast, all derivatives with free *ortho*-diphenolic groups **9a–h** and **11** exhibited IC₅₀ values of less than 10 μM. Among these compounds, the IC₅₀ values of two derivatives with an alkyl chain of average size (**9c**, 0.2 μM; and **9d**, 0.5 μM) and that of the derivative with a terminal double bond in the

alkyl chain (**9h**, 0.4 μM) stood out. The selectivity indices (SI) of these HT derivatives with respect to the non-tumor cells (MRC-5) were 62, 72, and 39, respectively. The increase in activity (AG) of the derivatives with respect to HT (**1**) was, respectively, 264-, 90-, and 116-fold.

Table 2. Trypanocidal Activity and Cytotoxicity of HT Alkylcarbonate Derivatives^a

Type of compound	Compound #	n	<i>T. brucei</i> IC ₅₀ (μM)	MRC-5 IC ₅₀ (μM)	SI	AG
Precursor	HT (1)		47.5 \pm 16.9 ^b	> 50 ^b	> 1	1.0
Benzylated monomers	8c	5	> 10	ND		
	8e	11	> 10	ND		
Debenzylated monomers	9a	1	1.4 \pm 0.7	34.5 \pm 1.0	25	33.7
	9b	3	7.2 \pm 2.3	ND		6.6
	9c	5	0.2 \pm 0.0	11.2 \pm 1.0	62	263.9
	9d	7	0.5 \pm 0.2	37.9 \pm 0.8	72	89.6
	9e	11	1.1 \pm 0.5	12.4 \pm 1.3	12	44.4
	9f	13	1.4 \pm 0.1	9.1 \pm 1.3	6	33.2
	9g	15	6.2 \pm 2.9	ND		7.7
	9h	8	0.4 \pm 0.2	15.9 \pm 0.9	39	115.8
Benzylated dimer	10		> 10	ND		
Debenzylated dimer	11		1.3 \pm 0.6	> 50	> 39	37.1

^an = number of methylene groups (CH₂) of the alkyl chain; SI = selectivity Index (IC₅₀ MRC-5 / IC₅₀ *T. brucei*); AG = activity gain (IC₅₀ HT (**1**) / IC₅₀ compound); ND = not determined. ^bFrom reference.²⁹

In conclusion, the trypanocidal activities and cytotoxicity of several ω -hydroxyalkylcarbonate and alkylcarbonate derivatives of hydroxytyrosol were analyzed. Low IC₅₀ values against *T. brucei* were observed for the HT alkylcarbonate derivatives **9c** (0.2 μM), **9d** (0.5 μM), and **9h** (0.4 μM), with an activity gain (AG) with respect to its precursor (HT) of 264-, 90-, and 116-fold, respectively. The three HT derivatives, with the *ortho*-diphenolic groups unprotected and with an alkyl chain of average size (**9c** and **9d**) or with a terminal double bond in the alkyl chain (**9h**), showed selectivity indices (SI) with respect to the non-tumor cells (MRC-5) of 62, 71, and 39, respectively, indicating a low cytotoxicity. In addition, low IC₅₀ values were also observed for the HT ω -hydroxyalkylcarbonate derivatives **6d**, (1.5 μM) and **7d** (1.0 μM), and for the HT alkylcarbonate derivatives **9a** (1.4 μM), **9e** (1.1 μM), **9f** (1.4 μM), and **11** (1.3 μM). The hydroxytyrosol derivatives with free *ortho*-diphenolic groups **6a–d**, **7a–d**, **9a–h**, and **11**

were more active than their corresponding benzylated derivatives **4a–d**, **5a–d**, **8c**, **8e**, and **10**.

6.3 EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. NMR spectra were recorded on a Varian direct drive (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz) spectrometer, using CDCl_3 as the solvent. The ^{13}C NMR chemical shifts were determined with the aid of DEPT, using a flip angle of 135° . IR spectra were recorded on a MATTSON SATELLITE FTIR spectrometer. The purity of the new compounds was determined by a WATERS ACQUITY UPLC system, coupled with a WATERS SYNAPT G2 HRMS spectrometer, with ESI. Merck silica-gel 60 aluminum sheets (1.16835) were used for TLC. Merck silica-gel 60 (0.040–0.063 mm, 1.09385) was used for flash chromatography. CH_2Cl_2 (Fisher, D/1852/17) with increasing amounts of Me_2CO (Fisher, A/0600/17) was used as eluent (all the solvents had an analytical reagent-grade purity).

Synthesis of Dibenzyl Hydroxytyrosol (2). From solid olive-mill wastes, called *alperujo* in Spanish, a phenolic extract was obtained.³³ The solid olive-mill wastes were dried and extracted with EtOAc. The organic layer was concentrated until precipitation of triterpene acids, which were filtered and removed. The concentrated organic layer was extracted with water, and the resulting aqueous layer was neutralized with NaHCO_3 . The aqueous layer was extracted with EtOAc (4 x 30 mL), dried with anhydrous Na_2SO_4 , and evaporated to dryness to afford a syrupy residue containing high proportions of HT (**1**), and other minor compounds.²⁶ In order to simplify the isolation of HT (**1**), its di-*O*-benzyl derivative was synthesized. The benzylation reaction was performed with 1 g of the phenolic extract dissolved in dry acetone (10 mL), adding K_2CO_3 (3 g) and BnCl (1.5 mL). The reaction mixture was stirred at reflux for 4 h, filtered, and the solvent was evaporated. The residue was dissolved in CH_2Cl_2 and washed three times with water. The organic layer was dried with anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated to dryness. The residue was purified by column chromatography, yielding the benzylated derivative (**2**, 72%).³⁴

Synthesis of Di-*O*-benzylhydroxytyrosolchloroformate (3). Compound **2** (1 mmol, 334 mg) was dissolved in THF (10 mL) at 0°C . To the cold mixture were slowly added diphosgene (DP, 1 mmol, 120 μL) and *N,N*-dimethylaniline (DMA, 1 mmol, 125 μL) under an Ar atmosphere. The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature, followed by the addition of Et_2O until no more precipitation occurred. The mixture was filtered and washed with water, and the organic layer dried with anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and evaporated to dryness. The residue was purified by chromatography to yield compound **3** (322 mg, 81%).²⁶

Synthesis of the Hydroxytyrosol ω -hydroxyalkylcarbonate Derivatives (4a–4d) and Their Corresponding Dimeric Derivatives (5a–d). A solution of *N,N*-diisopropylethylamine (2 mmol, 365 μ L), 4-dimethylaminopyridine (1 mmol, 125 mg), and 1 mmol of the respective terminal diol (ethane-1,2-diol, butane-1,4-diol, hexane-1,6-diol, and octane-1,8-diol) in toluene (5 mL) was prepared at 0 °C under Ar. To this solution, a solution of compound **3** (2 mmol, 794 mg) in toluene (5 mL) was added. Each mixture was stirred for 15 min at 0 °C and then maintained for 12 h at room temperature. The solvent was evaporated and the residue purified by chromatography to yield the products **4a–d** and **5a–d**, respectively, with the yields indicated below.

According to the general procedure, compound **3** (2 mmol, 794 mg) was coupled, respectively, with ethane-1,2-diol (1 mmol, 56 μ L), butane-1,4-diol (1 mmol, 89 μ L), hexane-1,6-diol (1 mmol, 118 mg), and octane-1,8-diol (1 mmol, 146 mg), to give the respective mixtures of two compounds. These mixtures were separated by column chromatography, yielding 338 mg of **4a** (40%) and 500 mg of **5a** (32%), 378 mg of **4b** (42%) and 518 mg of **5b** (32%), 430 mg of **4c** (45%) and 586 mg of **5c** (35%), or 408 mg of **4d** (40%) and 520 mg of **5d** (30%), respectively.

Table 3. NMR Spectroscopic Data (400 MHz, CDCl₃) of Compounds **4a–d**.

position	4a		4b		4c		4d	
	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)
1	130.6, C		130.6, C		130.7, C		130.7, C	
2	116.2, CH	6.84, d (2.0)	116.1, CH	6.85, brs	116.1, CH	6.84, d (2.0)	116.1, CH	6.84, d (2.0)
3	149.2, C		149.1, C		149.1, C		149.1, C	
4	148.0, C		147.9, C		147.9, C		147.9, C	
5	115.5, CH	6.88, d (8.2)	115.4, CH	6.89, brd (8.0)	115.5, CH	6.88, d (8.2)	115.4, CH	6.89, d (8.2)
6	122.0, CH	6.74, dd (8.2, 2.0)	121.9, CH	6.75, brd (8.0)	121.9, CH	6.74, dd (8.2, 2.0)	121.9, CH	6.74, dd (8.2, 2.0)
7	34.7, CH ₂	2.89, t (7.2)	34.7, CH ₂	2.89, t (7.0)	34.7, CH ₂	2.88, t (7.2)	34.7, CH ₂	2.87, t (7.2)
8	68.7, CH ₂	4.29, t (7.2)	68.3, CH ₂	4.28, t (7.0)	68.3, CH ₂	4.26, t (7.2)	68.3, CH ₂	4.26, t (7.2)
OCOO	155.4, C		155.2, C		155.3, C		155.3, C	
PhCH ₂ O	71.6, CH ₂	5.14, s	71.5, CH ₂	5.13, s	71.5, CH ₂	5.14, s	71.5, CH ₂	5.14, s
PhCH ₂	137.4, C		137.4, C		137.4, C		137.4, C	
PhCH ₂	128.5, CH		128.5, CH		128.5, CH		128.5, CH	
PhCH ₂	127.9, CH		127.8, CH		127.8, CH		127.8, CH	
PhCH ₂	127.6, CH	7.45-7.37, m	127.5, CH	7.46-7.32, m	127.5, CH	7.44-7.31, m	127.5, CH	7.44-7.30, m
PhCH ₂	127.5, CH		127.3, CH		127.4, CH		127.3, CH	
1'	69.4, CH ₂	4.24, t (4.6)	67.8, CH ₂	4.16, t (6.5)	68.0, CH ₂	4.12, t (6.7)	68.1, CH ₂	4.11, t (6.7)
2'	64.1, CH ₂	3.83, t (4.6)	25.2, CH ₂	1.75, m	28.7, CH ₂	1.67, m	28.7, CH ₂	1.65, m
3'			28.9, CH ₂	1.62, m	^a 25.6, CH ₂	1.41, m ^a	^a 25.7, CH ₂	1.33, m ^a
4'			62.2, CH ₂	3.64, t (6.2)	^a 25.4, CH ₂	1.40, m ^a	^a 25.7, CH ₂	1.33, m ^a
5'					32.6, CH ₂	1.56, m	^b 29.2, CH ₂	1.32, m ^a
6'					62.8, CH ₂	3.62, t (6.5)	^b 29.3, CH ₂	1.31, m ^a
7'							33.8, CH ₂	1.53, m
8'							62.9, CH ₂	3.61, t (6.5)

^{a,b}Interchangeable data within the same column.

3,4-Dibenzyloxyphenethyl-2-hydroxyethyl Carbonate (4a): Syrup; IR (film) ν_{\max} 3456, 2953, 1740, 1251 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (CDCl_3), see Table 3; ESI-HRMS m/z 423.1805 (calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{O}_6$ $[\text{M}+1]^+$, 423.1808).

3,4-Dibenzyloxyphenethyl-4-hydroxybutyl Carbonate (4b): Syrup; IR (film) ν_{\max} 3462, 2953, 1740, 1252 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (CDCl_3), see Table 3; ESI-HRMS m/z 451.2116 (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_6$ $[\text{M}+1]^+$, 451.2121).

3,4-Dibenzyloxyphenethyl-6-hydroxyhexyl Carbonate (4c): Syrup; IR (film) ν_{\max} 2927, 1743, 1256 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (CDCl_3), see Table 3; ESI-HRMS m/z 479.2448 (calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{O}_6$ $[\text{M}+1]^+$, 479.2434).

3,4-Dibenzyloxyphenethyl-8-hydroxyoctyl Carbonate (4d): Syrup; IR (film) ν_{\max} 3457, 2930, 1740, 1251 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (CDCl_3), see Table 3; ESI-HRMS m/z 507.2744 (calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{O}_6$ $[\text{M}+1]^+$, 507.2747).

Table 4. NMR Spectroscopic Data (400 MHz, CDCl_3) of Compounds **5a–d**.

position	5a		5b		5c		5d	
	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)
1	130.0, C		130.6, C		130.7, C		130.7, C	
2	116.2, CH	6.82, d (2.0)	116.2, CH	6.83, d (2.0)	116.2, CH	6.84, d (2.0)	116.2, CH	6.84, d (2.0)
3	149.2, C		149.1, C		149.1, C		149.1, C	
4	148.0, C		148.0, C		148.0, C		147.9, C	
5	115.5, CH	6.87, d (8.2)	115.4, CH	6.88, d (8.2)	115.3, CH	6.88, d (8.2)	115.3, CH	6.88, d (8.2)
6	122.0, CH	6.73, dd (8.2, 2.0)	122.0, CH	6.74, dd (8.2, 2.0)	122.0, CH	6.74, dd (8.2, 2.0)	122.0, CH	6.74, dd (8.2, 2.0)
7	34.7, CH_2	2.87, t (7.2)	34.7, CH_2	2.88, t (7.2)	34.7, CH_2	2.88, t (7.3)	34.7, CH_2	2.88, t (7.3)
8	68.8, CH_2	4.27, t (7.2)	68.4, CH_2	4.26, t (7.2)	68.4, CH_2	4.25, t (7.3)	68.3, CH_2	4.26, t (7.3)
OCOO	154.9, C		155.4, C		155.3, C		155.3, C	
PhCH_2O	71.6, CH_2	5.13, s	71.5, CH_2	5.14, s	71.5, CH_2	5.14, s	71.5, CH_2	5.14, s
PhCH_2	137.5, C		137.5, C		137.5, C		137.5, C	
PhCH_2	128.5, CH		128.5, CH		128.5, CH		128.5, CH	
PhCH_2	127.9, CH		127.9, CH		127.9, CH		127.9, CH	
PhCH_2	127.8, CH	7.44-7.30, m	127.8, CH	7.45-7.31, m	127.8, CH	7.44-7.31, m	127.8, CH	7.44-7.31, m
PhCH_2	127.5, CH		127.5, CH		127.5, CH		127.5, CH	
PhCH_2	127.4, CH		127.4, CH		127.4, CH		127.4, CH	
1'	65.3, CH_2	4.33, s	67.3, CH_2	4.14, m	67.9, CH_2	4.11, m	68.1, CH_2	4.11, m
2'			25.2, CH_2	1.76, m	28.6, CH_2	1.67, m	28.7, CH_2	1.67, m
3'					25.5, CH_2	1.40, m	25.7, CH_2	1.36, m
4'							29.2, CH_2	1.33, m

Bis(3,4-dibenzyloxyphenethyl)ethane-1,2-diyl Dicarbonate (5a): Syrup; IR (film) ν_{\max} 3031, 2931, 1739, 1251 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (CDCl_3), see Table 4; ESI-HRMS m/z 800.3413 (calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{50}\text{NO}_{10}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 800.3435).

Bis(3,4-dibenzyloxyphenethyl)butane-1,4-diyl Dicarboxylate (5b): Syrup; IR (film) ν_{\max} 2931, 1739, 1251 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (CDCl_3), see Table 4; ESI-HRMS m/z 828.3738 (calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{54}\text{NO}_{10}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 828.3748).

Bis(3,4-dibenzyloxyphenethyl)hexane-1,6-diyl Dicarboxylate (5c): Syrup; IR (film) ν_{\max} 2931, 1739, 1251 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (CDCl_3), see Table 4; ESI-HRMS m/z 856.4052 (calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{58}\text{NO}_{10}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 856.4061).

Bis(3,4-dibenzyloxyphenethyl)octane-1,8-diyl Dicarboxylate (5d): Syrup; IR (film) ν_{\max} 3031, 2931, 1741, 1256 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (CDCl_3), see Table 4; ESI-HRMS m/z 884.4375 (calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{62}\text{NO}_{10}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 884.4374).

Synthesis of the Hydroxytyrosol ω -Hydroxyalkylcarbonate Derivatives (6a–d) and Their Corresponding Dimeric Derivatives (7a–d). Compounds **4a–d** and **5a–d** were separately dissolved in EtOH (20 mL), and to each of these solutions was added a catalytic amount of Pd-C and hydrogenated at 5 atm of H_2 pressure for 24 h. The solution was filtered and the organic layer was concentrated under reduced pressure. Each residue was chromatographed, giving the debenzylated compounds **6a–d** and **7a–b**, respectively.

According to the general procedure described above, 200 mg of each compound (**4a**, 0.47 mmol; **4b**, 0.44 mmol; **4c**, 0.42 mmol; or **4d** 0.39 mmol) were debenzylated with H_2 to give respectively **6a** (102 mg, 89%), **6b** (98 mg, 82%), **6c** (105 mg, 84%), or **6d** (92 mg, 71%). Similarly, 300 mg of each compound (**5a**, 0.38 mmol; **5b**, 0.37 mmol; **5c**, 0.36 mmol, or **5d**, 0.34 mmol) were debenzylated with H_2 to give respectively **7a** (129 mg, 80%), **7b** (137 mg, 82%), **7c** (112 mg, 66%), or **7d** (123 mg, 71%).

3,4-Dihydroxyphenethyl-2-hydroxyethyl Carbonate (6a): Syrup; IR (film) ν_{\max} 3390, 1715, 1228 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (CDCl_3), see Table 5; ESI-HRMS m/z 243.0861 (calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_6$ $[\text{M}+1]^+$, 243.0869).

3,4-Dihydroxyphenethyl-4-hydroxybutyl Carbonate (6b): Syrup; IR (film) ν_{\max} 3381, 2955, 1721, 1250 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (CDCl_3), see Table 5; ESI-HRMS m/z 271.1173 (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_6$ $[\text{M}+1]^+$, 271.1182).

3,4-Dihydroxyphenethyl-6-hydroxyhexyl Carbonate (6c): Syrup; IR (film) ν_{\max} 3386, 2937, 1721, 1251 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (CDCl_3), see Table 5; ESI-HRMS m/z 299.1487 (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_6$ $[\text{M}+1]^+$, 299.1495).

3,4-Dihydroxyphenethyl-8-hydroxyoctyl Carbonate (6d): Syrup; IR (film) ν_{\max} 3405, 2930, 1720, 1249 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (CDCl_3), see Table 5; ESI-HRMS m/z 327.1796 (calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_6$ $[\text{M}+1]^+$, 327.1808).

Table 5. NMR Spectroscopic Data (400 MHz, CDCl₃) of Compounds **6a–d**.

position	6a		6b		6c		6d	
	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)
1	129.7, C		129.6, C		129.6, C		129.6, C	
2	115.9, CH	6.72, d (2.0)	116.0, CH	6.70, d (2.0)	115.8, CH	6.70, d (2.0)	115.8, CH	6.71, d (2.0)
3	144.0, C		144.1, C		144.2, C		144.2, C	
4	143.0, C		143.0, C		143.0, C		142.9, C	
5	115.2, CH	6.78, d (8.0)	115.3, CH	6.76, d (8.0)	115.2, CH	6.75, d (8.0)	115.2, CH	6.75, d (8.0)
6	121.0, CH	6.61, dd (8.0, 2.0)	120.9, CH	6.58, dd (8.0, 2.0)	120.9, CH	6.58, dd (8.0, 2.0)	120.9, CH	6.58, dd (8.0, 2.0)
7	34.6, CH ₂	2.85, t (6.8)	34.6, CH ₂	2.82, t (6.8)	34.6, CH ₂	2.82, t (7.0)	34.5, CH ₂	2.82, t (7.1)
8	68.9, CH ₂	4.31, t (6.8)	68.7, CH ₂	4.27, t (6.8)	68.6, CH ₂	4.26, t (7.0)	68.6, CH ₂	4.26, t (7.1)
OCOO	155.4, C		155.3, C		155.4, C		155.4, C	
1'	69.2, CH ₂	4.23, t (4.5)	67.9, CH ₂	4.12, t (6.3)	68.1, CH ₂	4.08, t (6.5)	68.2, CH ₂	4.09, t (6.6)
2'	61.0, CH ₂	3.83, t (4.5)	25.2, CH ₂	1.70, m	28.5, CH ₂	1.61, m	28.6, CH ₂	1.62, m
3'			28.8, CH ₂	1.61, m	^a 25.5, CH ₂	1.35, m	25.6, CH ₂	1.33, m
4'			62.2, CH ₂	3.64, t (6.3)	^a 25.3, CH ₂	1.35, m	29.1, CH ₂	1.30, m
5'					32.3, CH ₂	1.56, m	29.1, CH ₂	1.30, m
6'					62.6, CH ₂	3.61, t (6.5)	25.6, CH ₂	1.33, m
7'							32.5, CH ₂	1.54, m
8'							62.9, CH ₂	3.63, t (6.6)

^aInterchangeable data within the same column.

3,4-Dihydroxyphenethylethane-1,2-diyl Dicarbonate (7a): Syrup; IR (film) ν_{\max} 3409, 3003, 1709, 1220 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃), see Table 6; ESI-HRMS m/z 440.1508 (calcd for C₂₀H₂₆NO₁₀ [M+NH₄]⁺, 440.1498).

3,4-Dihydroxyphenethylbutane-1,4-diyl Dicarbonate (7b): Syrup; IR (film) ν_{\max} 3380, 2959, 1716, 1246 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃), see Table 6; ESI-HRMS m/z 468.1833 (calcd for C₂₂H₃₀NO₁₀ [M+NH₄]⁺, 468.1811).

3,4-Dihydroxyphenethylhexane-1,6-diyl Dicarbonate (7c): Syrup; IR (film) ν_{\max} 3387, 2937, 1701, 1248 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃), see Table 6; ESI-HRMS m/z 496.2151 (calcd for C₂₄H₃₄NO₁₀ [M+NH₄]⁺, 496.2183).

3,4-Dihydroxyphenethyloctane-1,8-diyl Dicarbonate (7d): Syrup; IR (film) ν_{\max} 3380, 2930, 1713, 1247 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃), see Table 6; ESI-HRMS m/z 507.2213 (calcd for C₂₆H₃₅O₁₀ [M+H]⁺, 507.2230).

Table 6. NMR Spectroscopic Data (400 MHz, CDCl₃) of Compounds **7a–d**.

position	7a		7b		7c		7d	
	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)
1	129.8, C		129.6, C		129.8, C		129.9, C	
2	115.9, CH	6.72, d (2.0)	116.0, CH	6.73, d (2.0)	115.9, CH	6.72, d (2.0)	115.9, CH	6.73, d (2.0)
3	143.9, C		144.1, C		144.0, C		144.0, C	
4	142.9, C		143.0, C		142.8, C		142.7, C	
5	115.3, CH	6.78, d (8.0)	115.3, CH	6.77, d (8.2)	115.3, CH	6.76, d (8.1)	115.3, CH	6.77, d (8.1)
6	121.2, CH	6.61, dd (8.0, 2.0)	120.9, CH	6.61, dd (8.2, 2.0)	121.1, CH	6.60, dd (8.1, 2.0)	122.2, CH	6.61, dd (8.1, 2.0)
7	34.4, CH ₂	2.84, t (6.3)	34.6, CH ₂	2.84, t (6.7)	34.6, CH ₂	2.83, t (7.0)	34.6, CH ₂	2.84, t (7.1)
8	69.1, CH ₂	4.30, t (6.3)	68.7, CH ₂	4.28, t (6.7)	68.6, CH ₂	4.27, t (7.0)	68.6, CH ₂	4.27, t (7.1)
OCOO	155.0, C		155.3, C		155.5, C		155.5, C	
1'	65.5, CH ₂	4.32, s	67.9, CH ₂	4.13, m	68.0, CH ₂	4.09, t (6.5)	68.2, CH ₂	4.10, t (6.6)
2'			25.2, CH ₂	1.71, m	28.5, CH ₂	1.63, m	28.6, CH ₂	1.63, m
3'					25.4, CH ₂	1.36, m	25.6, CH ₂	1.33, m
4'							29.0, CH ₂	1.30, m

Strains and Parasite Culture Conditions. Bloodstream forms of *T. brucei brucei* “single-marker” S427 (S16)³⁵ were cultivated as previously described, at 37 °C and 5% CO₂, in HMI-9 medium supplemented with 10% hiFBS.³⁶ MRC-5 cells were maintained at 37 °C and 5% CO₂ at 100% of humidity in low glucose DMEM (1 g/L) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (hiFBS), 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin.

Trypanocidal Activity. The drug susceptibility assay was performed as described.³⁷ Briefly, the parasites ($1 \cdot 10^4$ BSF/mL) were incubated in 96-well plates with an increasing concentration of each compound tested, for 72 h at 37 °C, and 5% CO₂ in culture medium. Cell proliferation was determined by the alamarBlue® assay to determine drug sensitivity of in vitro bloodstream forms.³⁸ Fluorescence was measured with an Infinite F200 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria) equipped respectively with 550 and 590 nm filters for excitation and emission wavelengths.

Toxicity on MRC-5 Cells. MRC-5 cells were harvested by trypsinization (0.25%) and seeded in 96-well plates (5000 cells in 100 μ L/well) in the presence of increasing concentrations of the HT derivatives tested. Cellular toxicity was determined using the MTT-based colorimetric assay, after incubation at 37 °C for 72 h.³⁹ The results are expressed as the concentration of each compound that inhibits cell growth by 50% vs. untreated control cells (IC₅₀).

ASSOCIATED CONTENT**Supporting Information**

¹H NMR, ¹³C NMR and DEPT spectra of compounds **4a–d**, **5a–d**, **6a–d**, and **7a–d** (Figures S1–S16). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION**Corresponding Authors**

* Tel./Fax: +34 958 240479. E-mail: frivas@ugr.es (F. Rivas). ORCID: 0000-0001-6619-8521

* Tel.: +34-958-181658. Fax: +34-958-181633. E-mail: josepv@ipb.csic.es (J.M. Pérez-Victoria).

* Tel.: +34 958 240480. Fax: +34 958 248437. E-mail: aparra@ugr.es (A. Parra). ORCID: 0000-0001-7485-8753

Notes

The first two authors (Ignacio and Marta) contributed equally to this research.

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the grant P11-FQM-7372 from the “Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa” of the “Junta de Andalucía”, and the grant SAF2016-80228-R from the “Ministerio de Economía y Competitividad” of Spain. This work was also supported by grants from the Junta de Andalucía (FQM0139 and BIO1786) and by FEDER funds from the EU. MMG wishes to thank the FPI fellowship granted by the “Ministerio de Economía y Competitividad” of Spain. MMG was a student of the Biochemistry and Molecular Biology Ph.D. program of the University of Granada (Spain). We thank David Nesbitt for reviewing the English of the manuscript.

6.4 REFERENCES

- (1) CDCs Neglected Tropical Diseases Program. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html> (accessed February 21, 2018).
- (2) Aksoy, S.; Buscher, P.; Van Den Abbeele, J.; Lehane, M.; Solano, P. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005454.
- (3) Jacobs, R. T.; Nare, B.; Phillips, M. A. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 1255–1274.
- (4) Babokhov, P.; Sanyaolu, A. O.; Oyibo, W. A.; Fagbenro-Beyioku, A. F.; Iriemenam, N. C. *Pathog. Global Health* **2013**, *107*, 242–252.
- (5) Dially, O.; Cecchi, G.; Wanda, G.; Argiles-Herrero, R.; Vreysen, M. J. B.; Cattoli, G.; Viljoen, G. J.; Mattioli, R.; Bouyer, J. *Trends Parasitol.* **2017**, *33*, 499–509.
- (6) Vreysen, M. J. B.; Seck, M. T.; Sall, B.; Bouyer, J. *J. Invertebr. Pathol.* **2013**, *112* Suppl., S15–25.
- (7) Cullen, D. R.; Mocerino, M. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24*, 701–717.
- (8) Oliviero, F.; Scanu, A.; Zamudio-Cuevas, Y.; Punzi, L.; Spinella, P. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 1653–1659.
- (9) Daglia, M. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *23*, 174–181.
- (10) Choi, D. Y.; Lee, Y. J.; Hong, J. T.; Lee, H. J. *Brain Res. Bull.* **2012**, *87*, 144–153.
- (11) Fresco, P.; Borges, F.; Marques, M. P. M.; Diniz, C. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 114–134.
- (12) Yu, S.; Zhao, G. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 5536–5561.
- (13) Rodriguez-Morato, J.; Xicota, L.; Fito, M.; Farre, M.; Dierssen, M.; De la Torre, R. *Molecules* **2015**, *20*, 4655–4680.
- (14) Covas, M. I.; Fito, M.; De la Torre, R. *Br. J. Nutr.* **2015**, *113*, S19–S28.
- (15) Hu, T.; He, X. W.; Jiang, J. G.; Xu, X. L. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 1449–1455.
- (16) Bernini, R.; Merendino, N.; Romani, A.; Velotti, F. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 655–670.
- (17) Visioli, F.; Bernardini, E. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 786–804.
- (18) Fernandez-Bolanos, J. G.; Lopez, O.; Lopez-Garcia, M. A.; Marset, A. In *Biological Properties of Hydroxytyrosol and its Derivatives; Olive Oil: Constituents*,

Quality, Health Properties and Bioconversions; Dimitrios B., Ed.; InTech, 2012; pp 375–396.

(19) Calderon-Montano, J. M.; Madrona, A.; Burgos-Moron, E.; Orta, M. L.; Mateos, S.; Espartero, J. L.; Lopez-Lazaro, M. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 5046–5053.

(20) Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Bravo, L.; Espartero, J. L.; Alcudia, F.; Cert, A.; Mateos, R. *Food Chem.* **2009**, *115*, 86–91.

(21) Bernini, R.; Carastro, I.; Palmi, G.; Tanini, A.; Zonefrati, R.; Pinelli, P.; Brandi, M. L.; Romani, A. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 6506–6512.

(22) Candiracci, M.; Madrona, A.; Espartero, J. L.; Zappia, G.; Piatti, E. *J. Funct. Foods* **2016**, *23*, 339–347.

(23) Bernini, R.; Crisante, F.; Barontini, M.; Tofani, D.; Balducci, V.; Gambacorta, A. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7408–7416

(24) Bernini, R.; Crisante, F.; Merendino, N.; Molinari, R.; Soldatelli, M. C.; Velotti, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 439–446.

(25) Procopio, A.; Celia, C.; Nardi, M.; Oliverio, M.; Paolino, D.; Sindona, G. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2377–2381.

(26) Fernandez-Pastor, I.; Fernandez-Hernandez, A.; Rivas, F.; Martinez, A.; Garcia-Granados, A.; Parra, A. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1737–1745.

(27) Bernini, R.; Gilardini Montani, M. S.; Merendino, N.; Romani, A.; Velotti, F. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9089–9107.

(28) Chillemi, R.; Sciuto, S.; Spatafora, C.; Tringali, C. In *Hydroxytyrosol Lipophilic Analogues: Synthesis, Radical Scavenging Activity and Human Cell Oxidative Damage Protection; Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*; Preedy, V. R.; Watson R. R., Eds.; Elsevier: London, 2010; pp 1233–1243.

(29) Belmonte-Reche, E.; Martinez-Garcia, M.; Peñalver, P.; Gomez-Perez, V.; Lucas, R.; Gamarro, F.; Perez-Victoria, J. M.; Morales, J. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *119*, 132–140.

(30) Gambacorta, A.; Tofani, D.; Bernini, R.; Migliorini, A. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3386–3391.

(31) De Rycker, M.; Hallyburton, I.; Thomas, J.; Campbell, L.; Wyllie, S.; Joshi, D.; Cameron, S.; Gilbert, I. H.; Wyatt, P. G.; Frearson, J. A.; Fairlamb, A. H.; Gray, D. W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 2913–2922.

(32) Pham, T. T.; Walden, M.; Butler, C.; Diaz-Gonzalez, R.; Perez-Moreno, G.; Ceballos-Perez, G.; Gomez-Perez, V.; Garcia-Hernandez, R.; Zecca, H.; Krakoff, E.; Kopec, B.; Ichire, O.; Mackenzie, C.; Pitot, M.; Ruiz, L. M.; Gamarro, F.; Gonzalez-

Pacanowska, D.; Navarro, M.; Dounay, A. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 3629–3635.

(33) Garcia-Granados, A.; Parra, A. PCT Int. Appl. WO 2007093659, 2007.

(34) Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Mateos, R.; Rodriguez, G.; Trujillo, M.; Fernandez-Bolaños, J.; Espartero, J. L. *Molecules* **2009**, *14*, 1762–1772.

(35) Wirtz, E.; Leal, S.; Ochatt, C.; Cross, G. A. M. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1999**, *99*, 89–101.

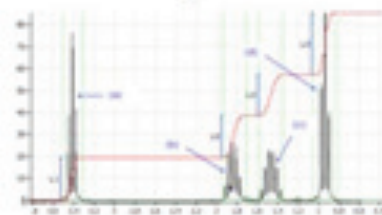
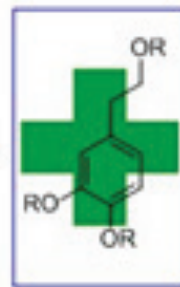
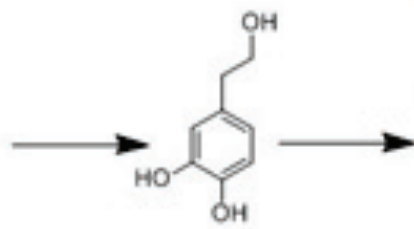
(36) Cabello-Donayre, M.; Malagarie-Cazenave, S.; Campos-Salinas, J.; Galvez, F. J.; Rodriguez-Martinez, A.; Pineda-Molina, E.; Orrego, L. M.; Martinez-Garcia, M.; Sanchez-Cañete, M. P.; Estevez, A. M.; Perez-Victoria, J. M. *Mol. Microbiol.* **2016**, *101*, 895–908.

(37) Carvalho, L.; Martinez-Garcia, M.; Perez-Victoria, I.; Manzano, J. I.; Yardley, V.; Gamarro, F.; Perez-Victoria, J. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 6151–6160.

(38) Raz, B.; Iten, M.; Grether-Buhler, Y.; Kaminsky, R.; Brun, R. *Acta Trop.* **1997**, *68*, 139–147.

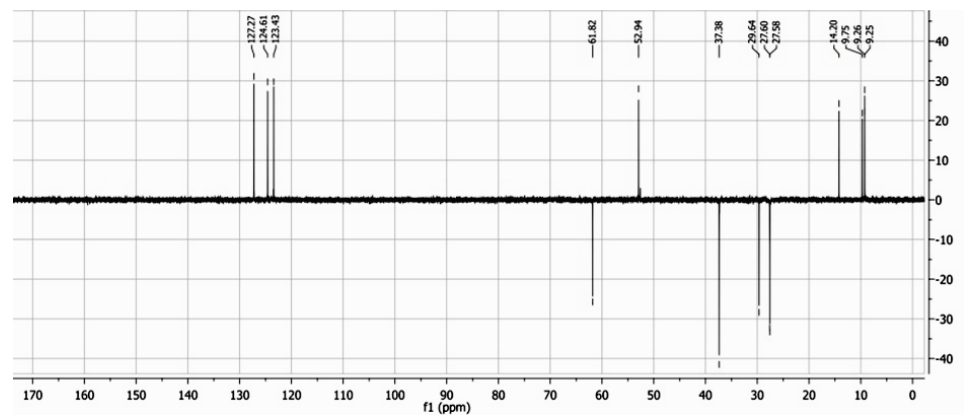
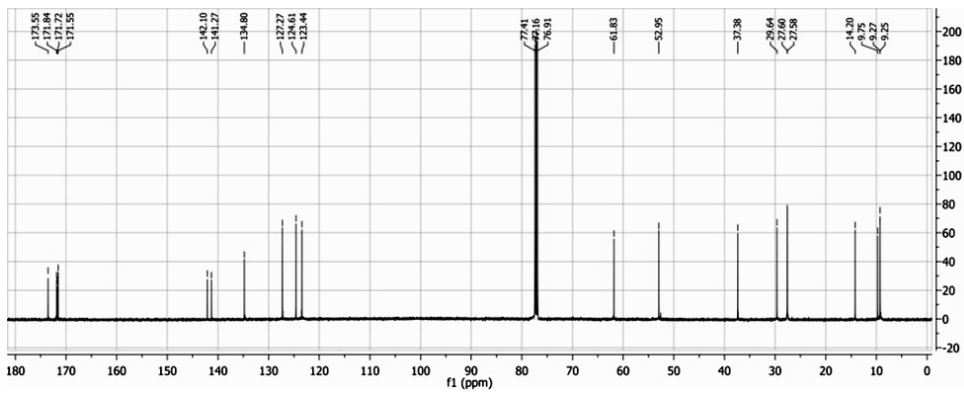
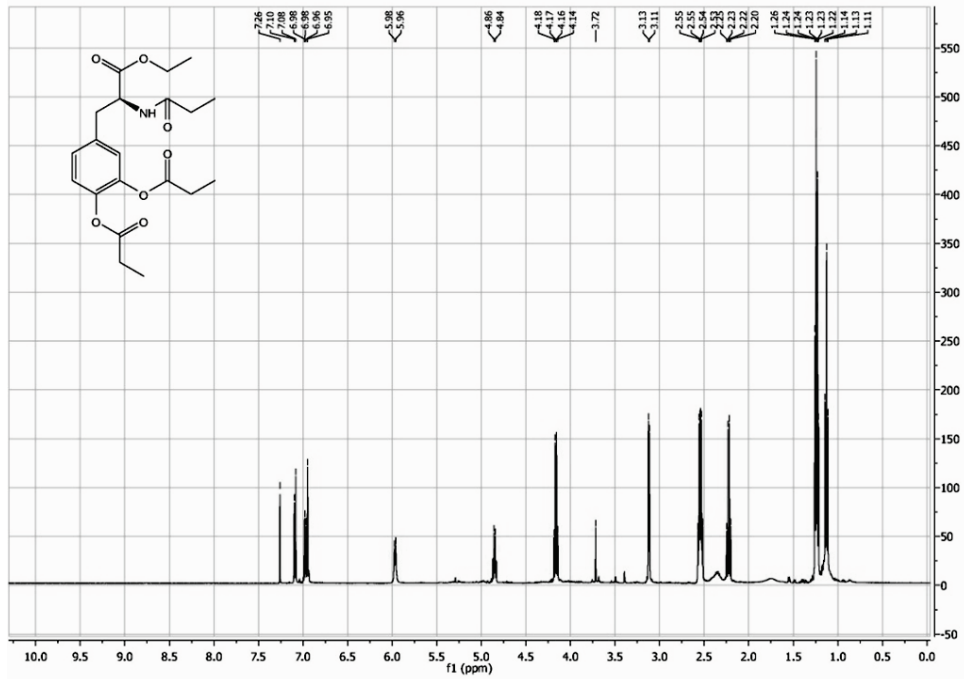
(39) Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.

ESPECTROS RMN

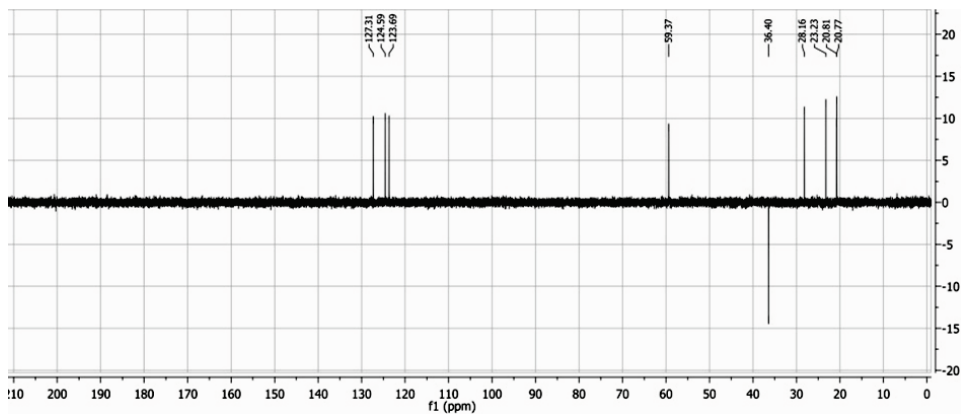
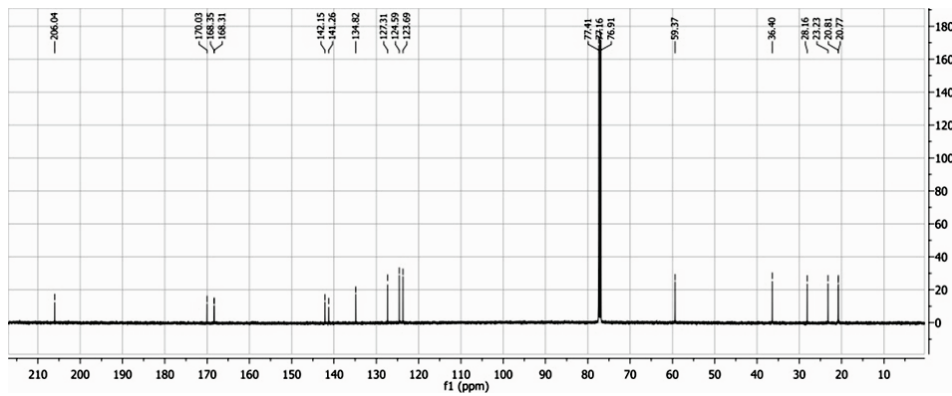
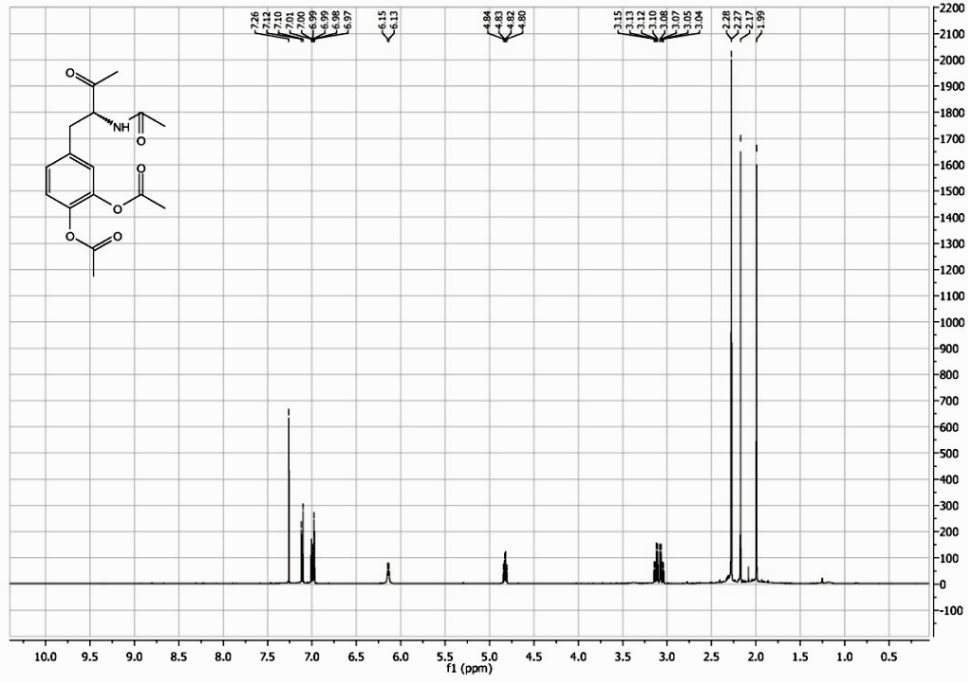


7.1. ESPECTROS RMN PUBLICACIÓN 2

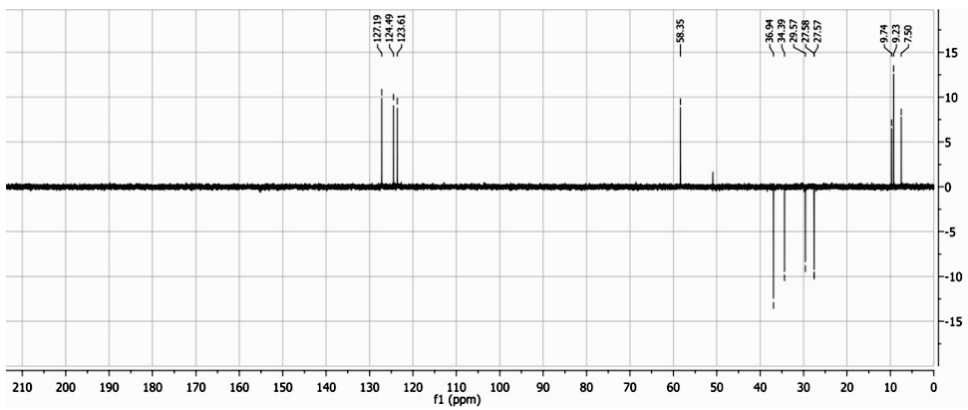
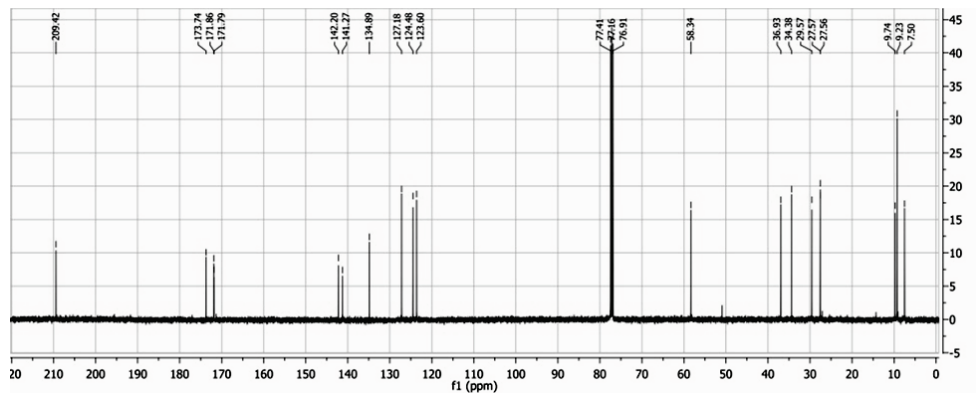
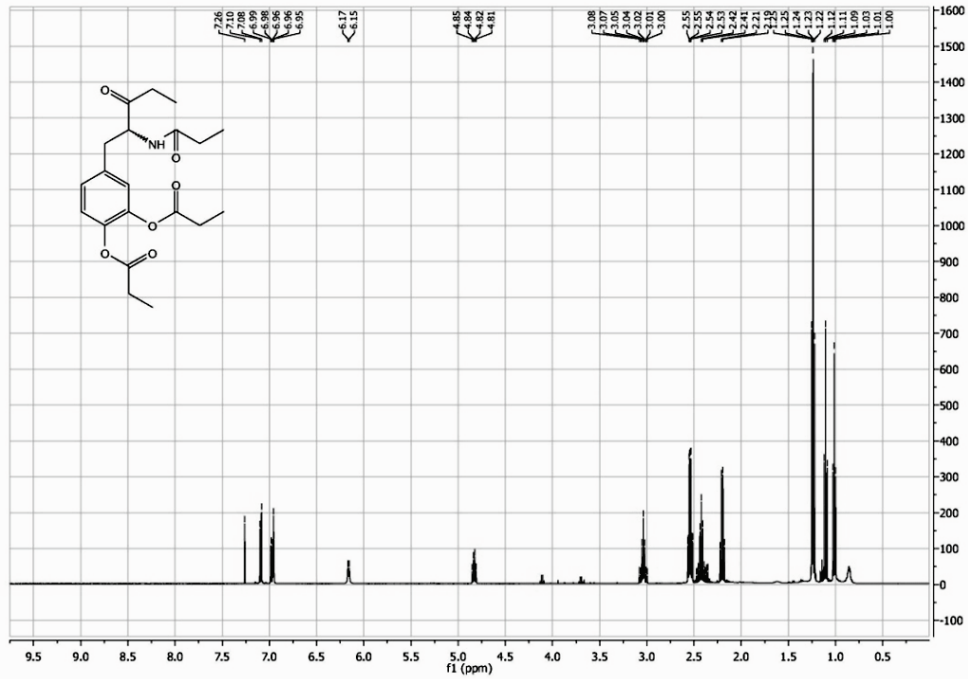
Producto 6



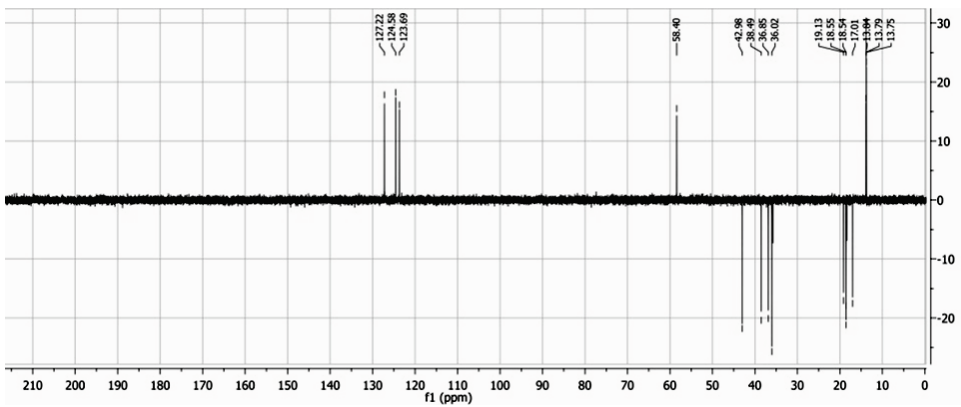
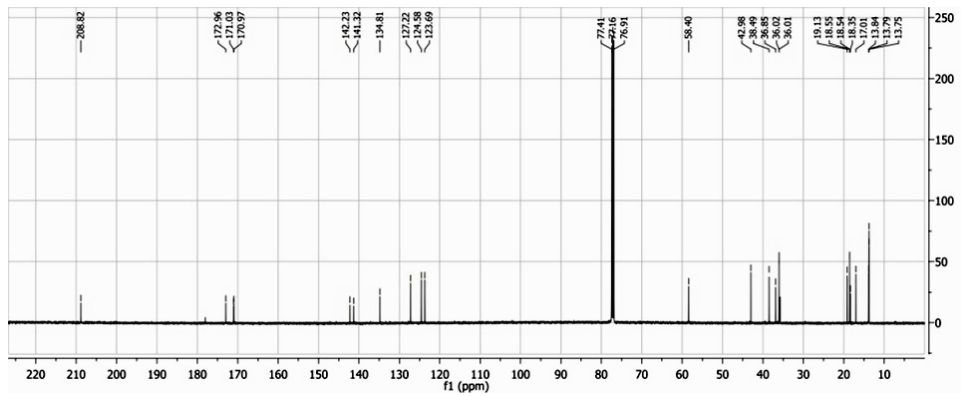
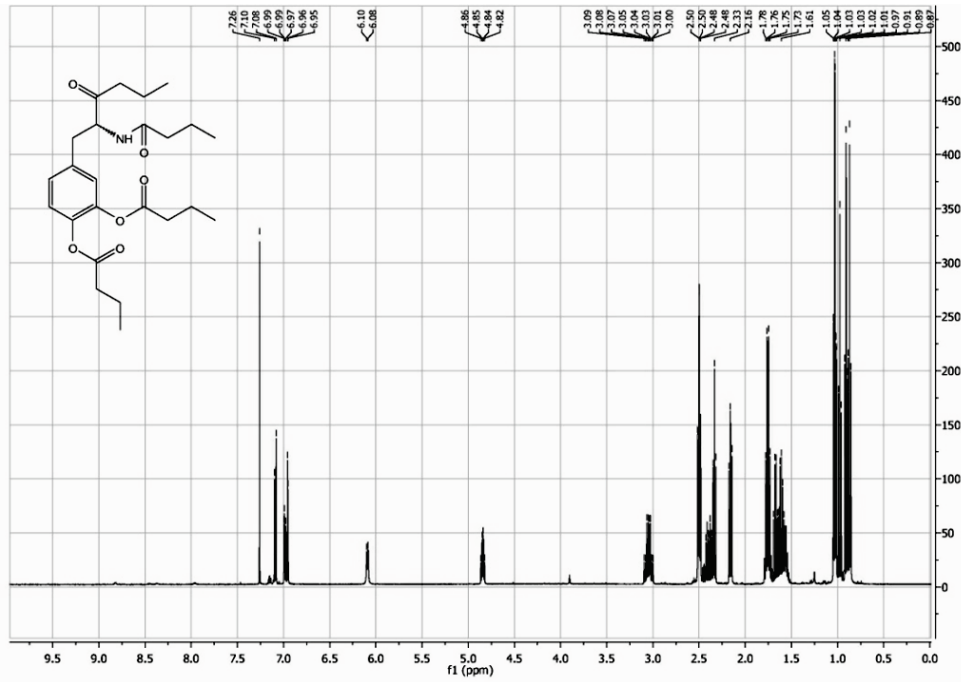
Producto 7



Producto 8

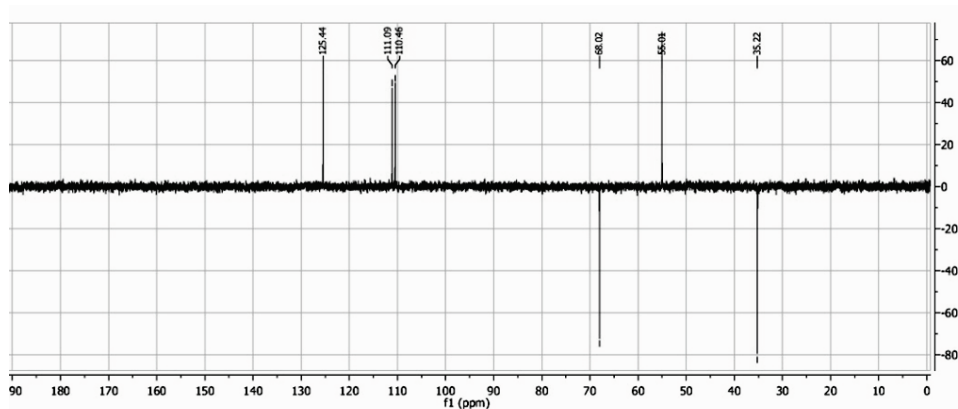
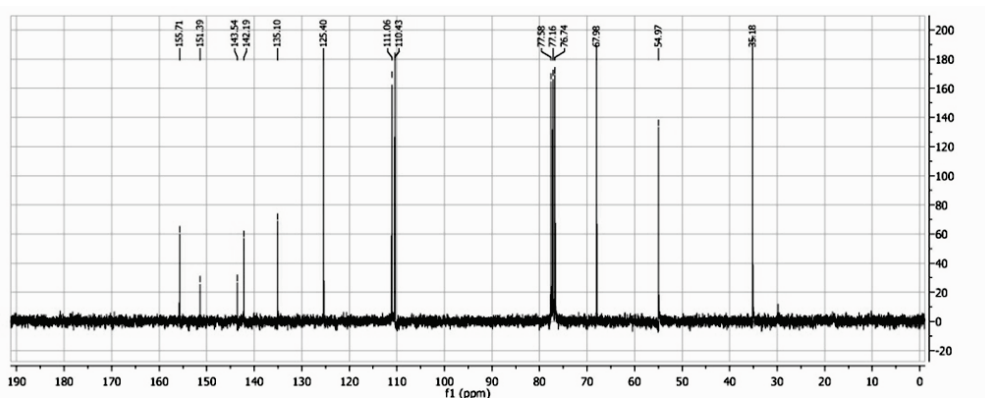
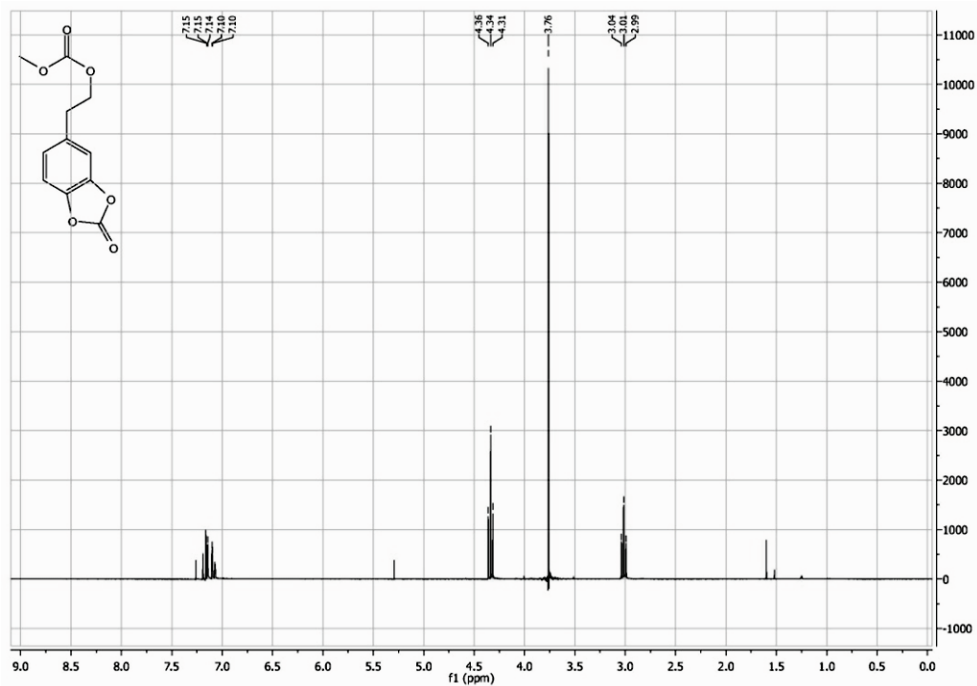


Producto 9

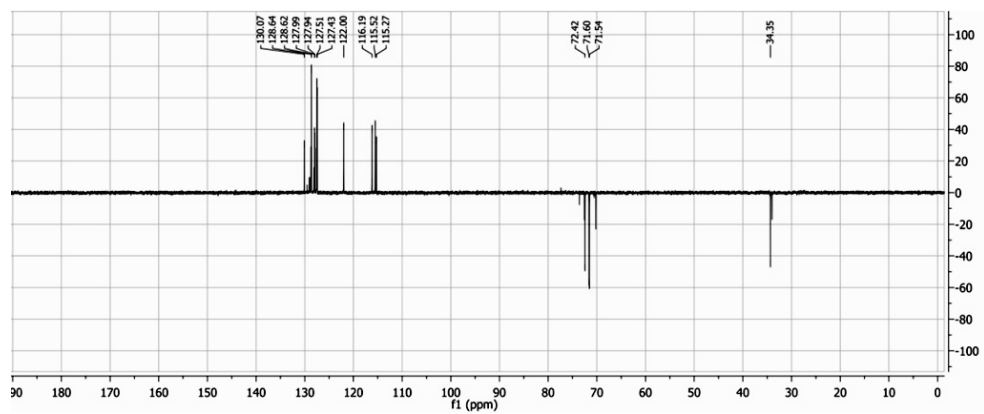
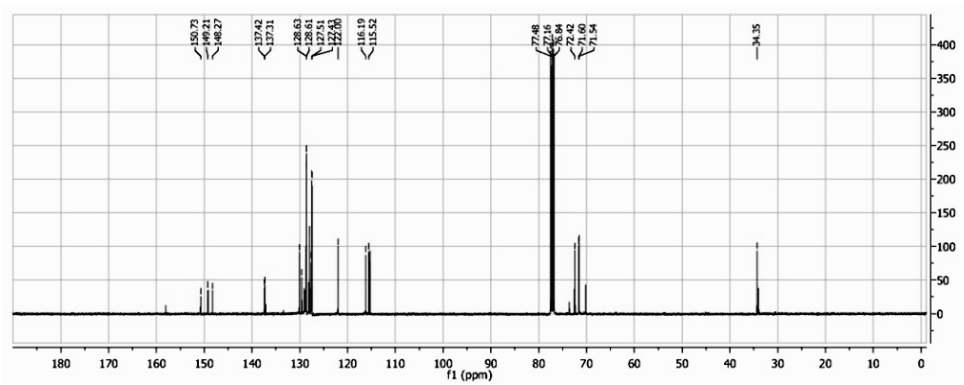
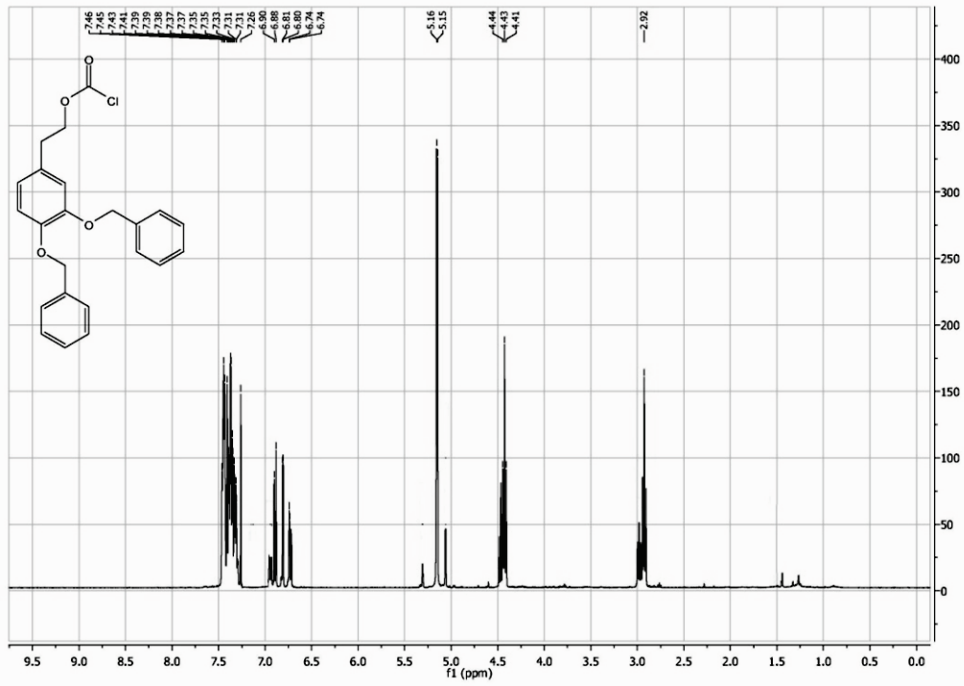


7.2. ESPECTROS RMN PUBLICACIÓN 3

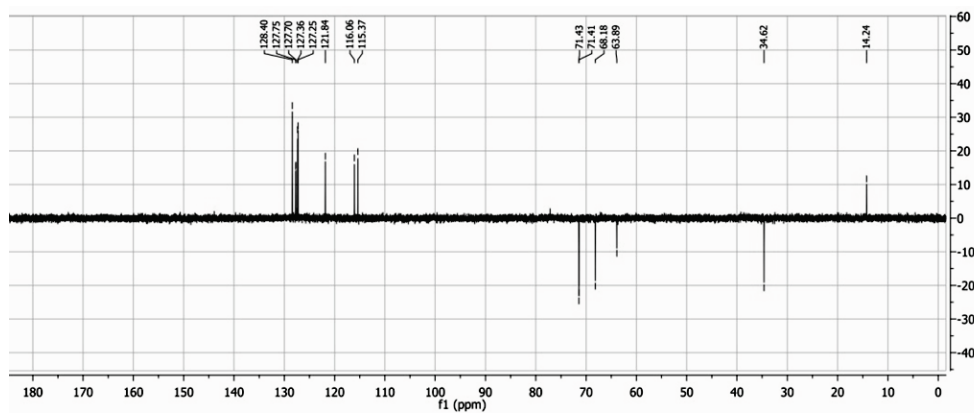
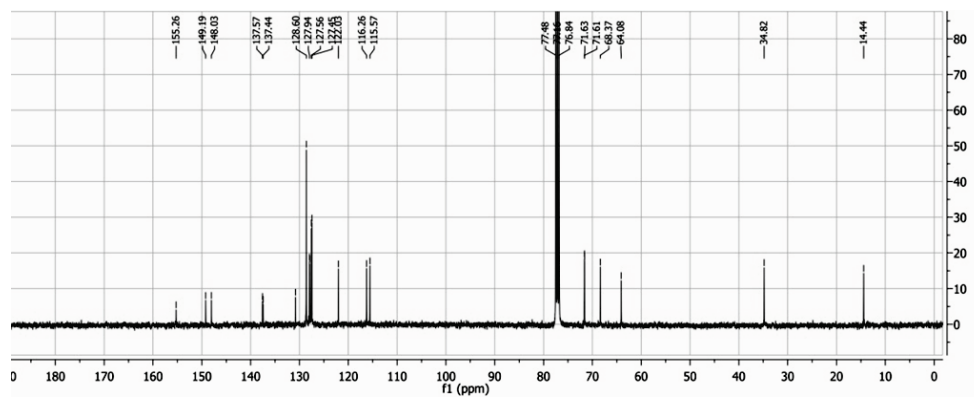
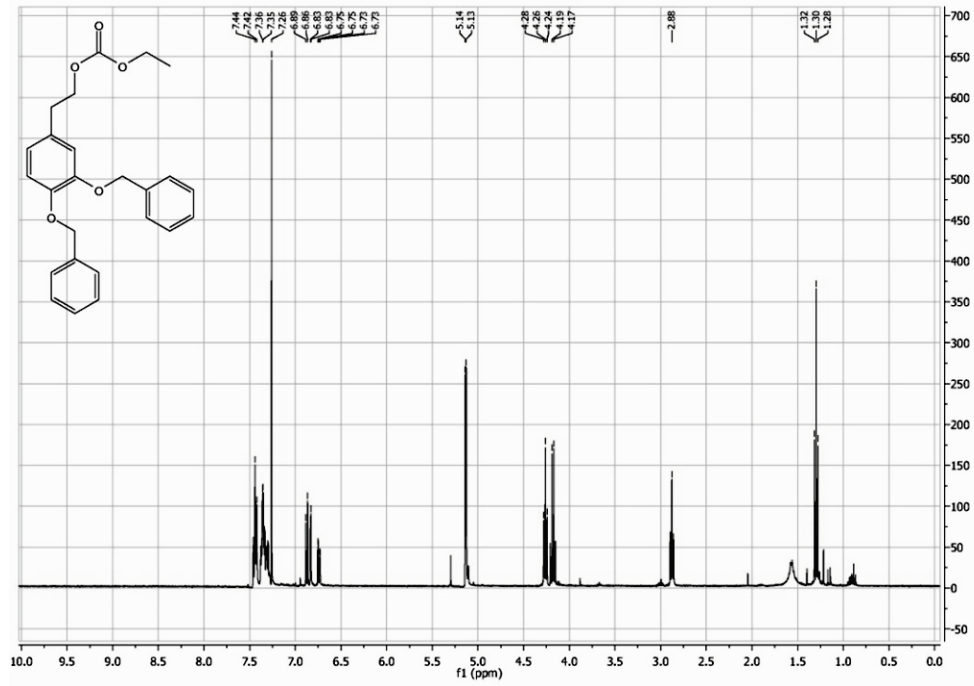
Producto 11



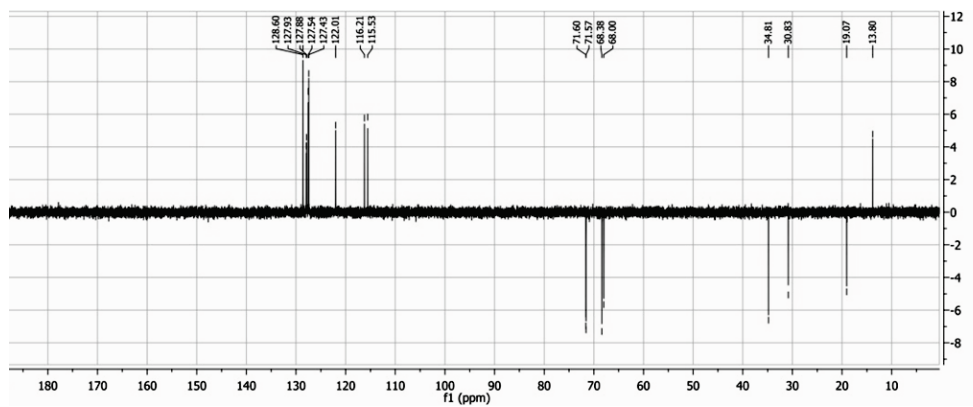
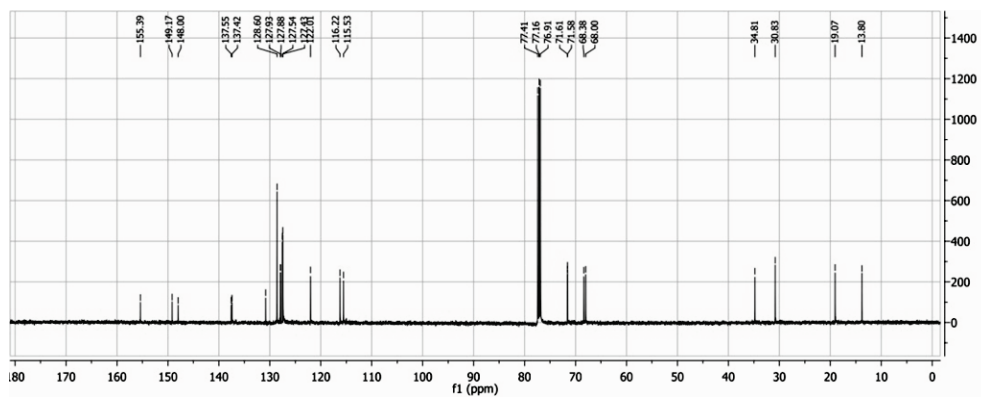
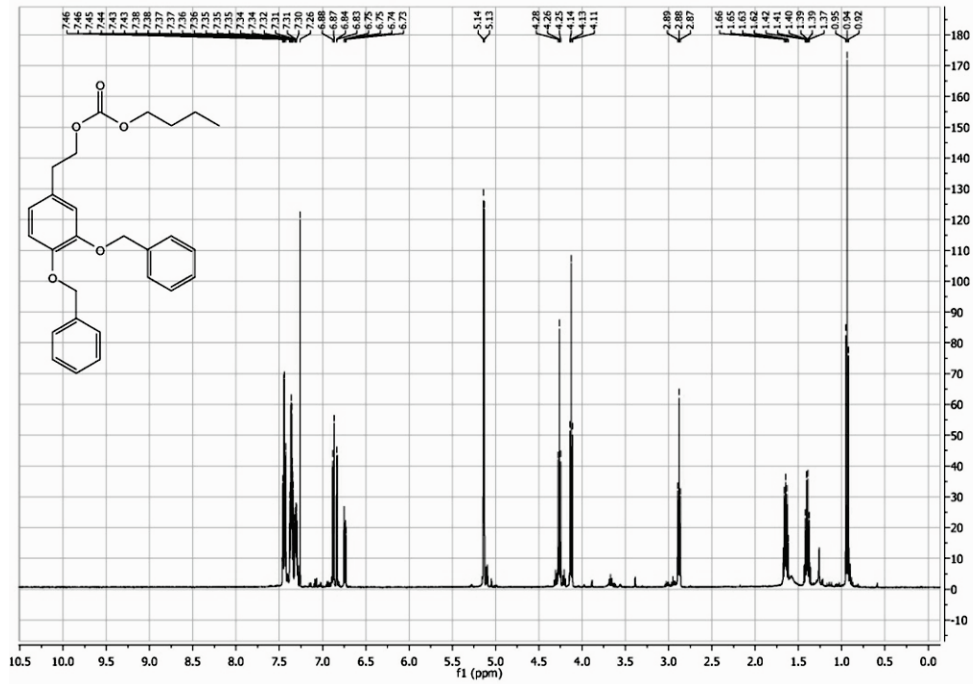
Producto 13



Producto 14

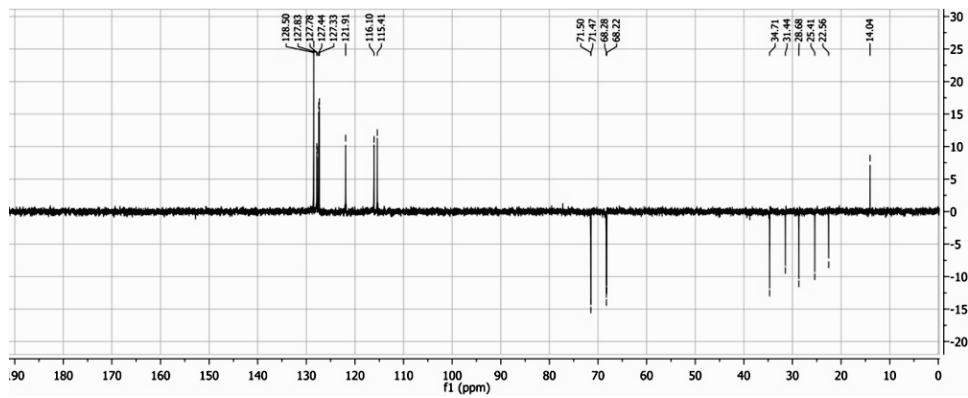
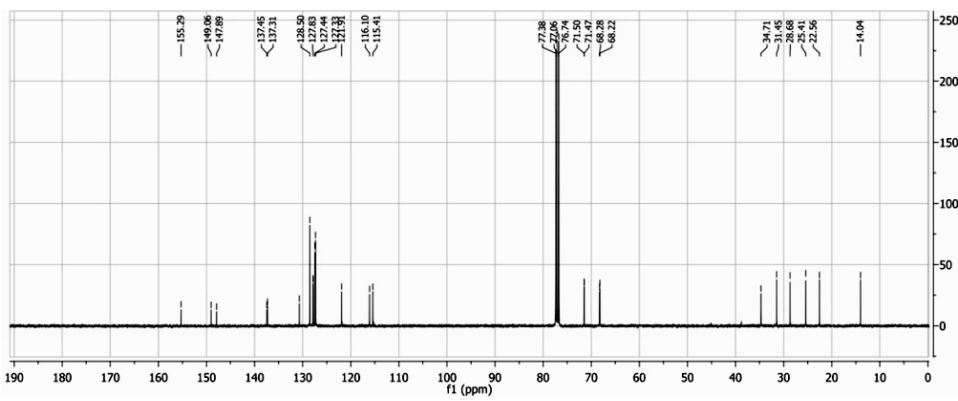
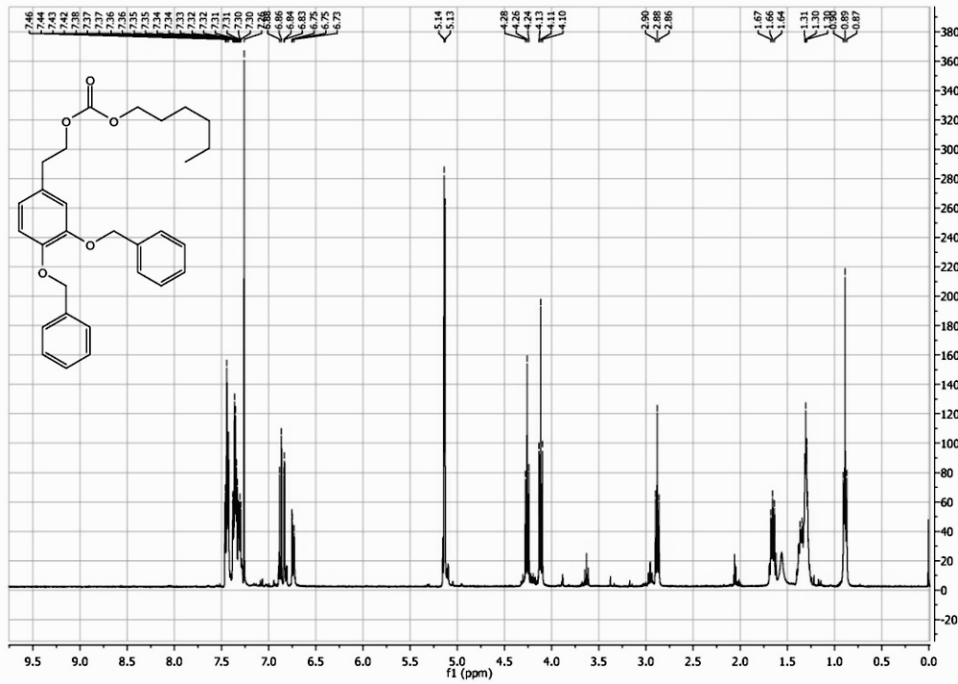


Producto 15

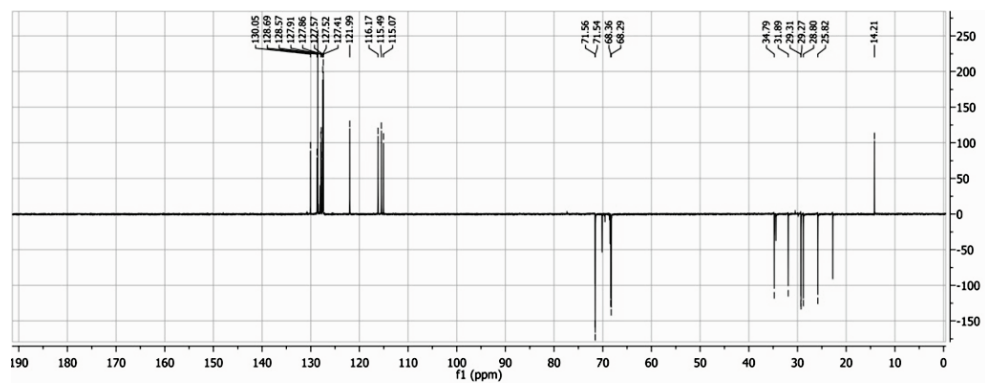
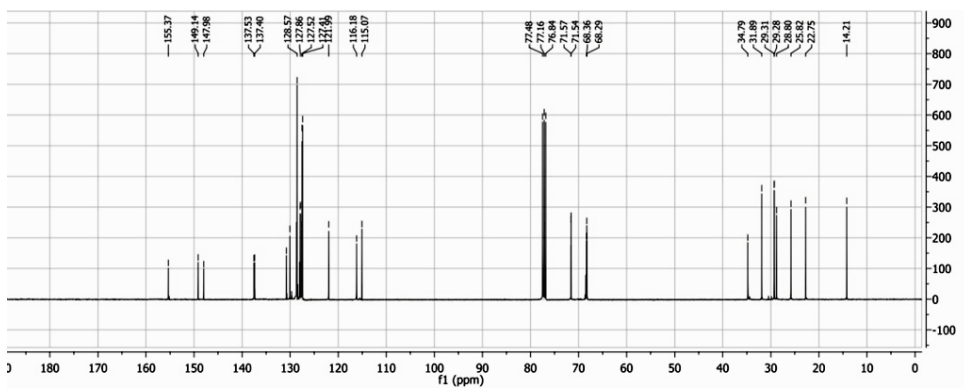
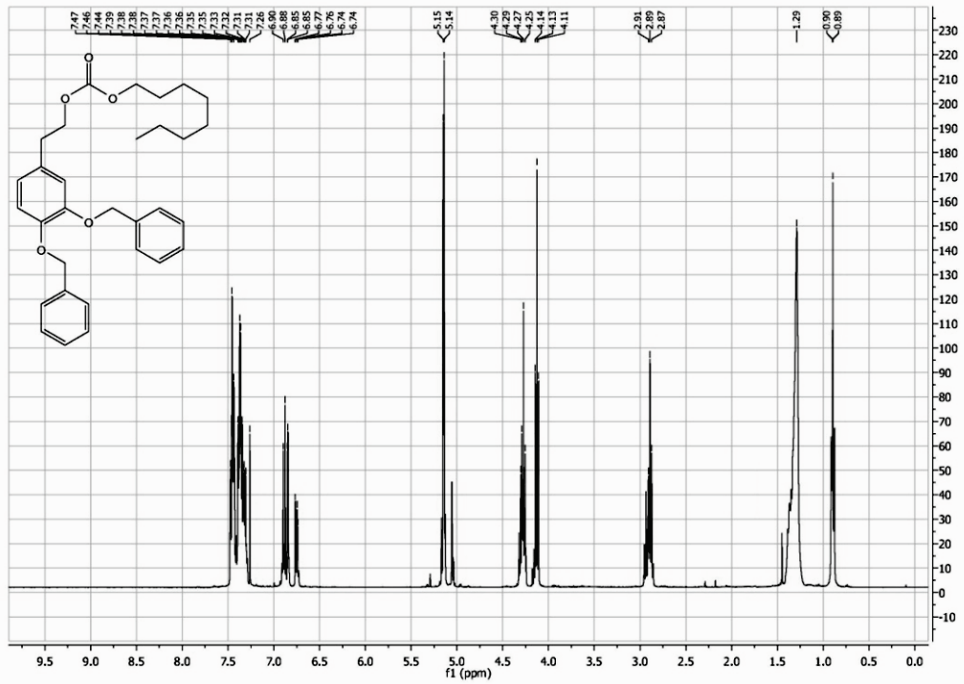


CAPÍTULO 7. ESPECTROS RMN

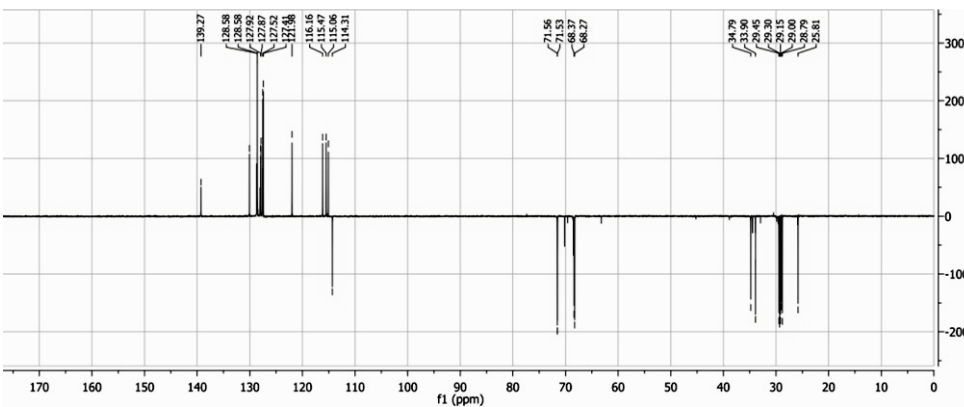
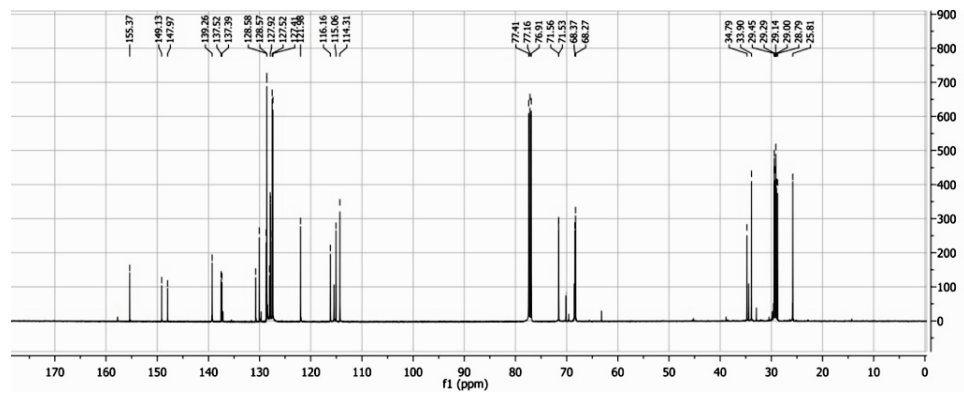
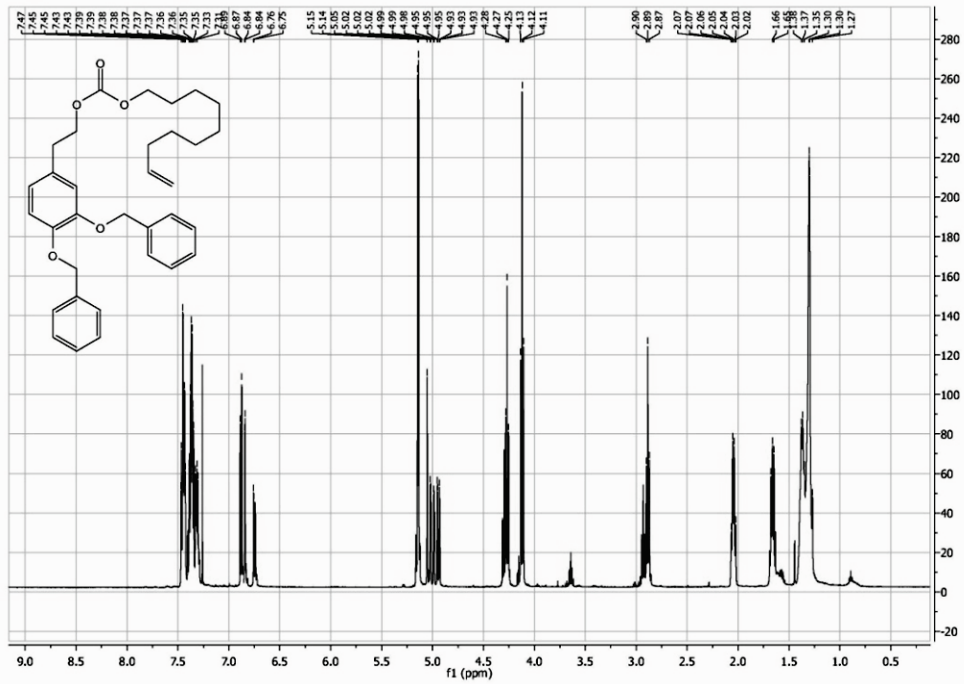
Producto 16



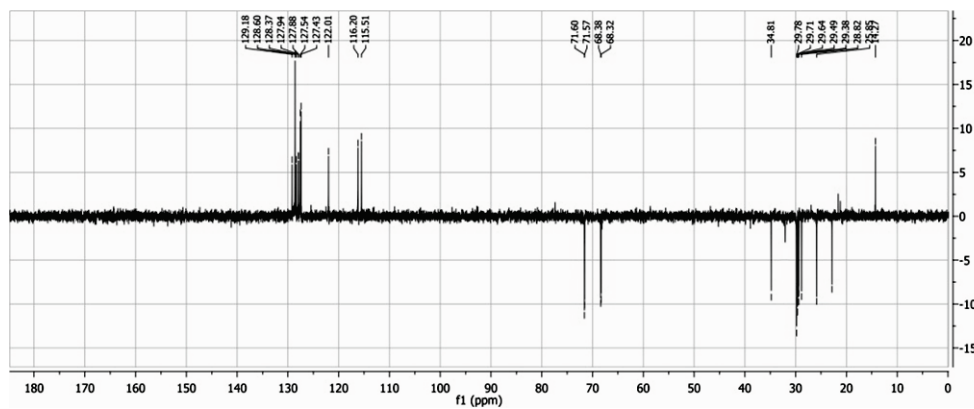
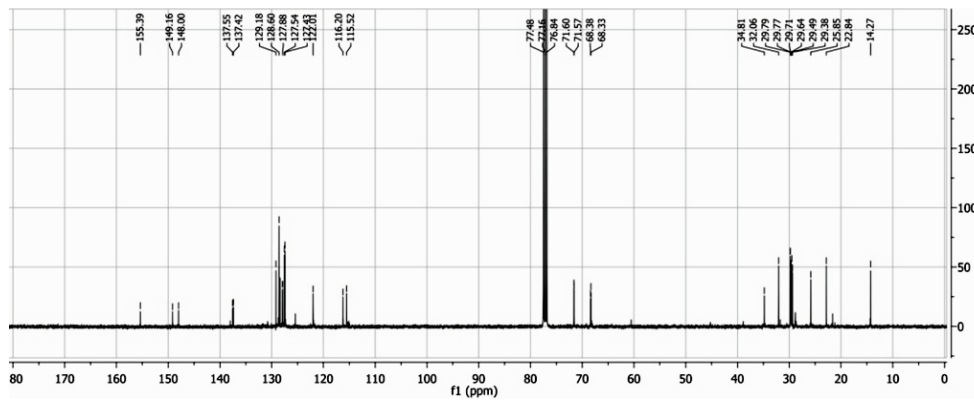
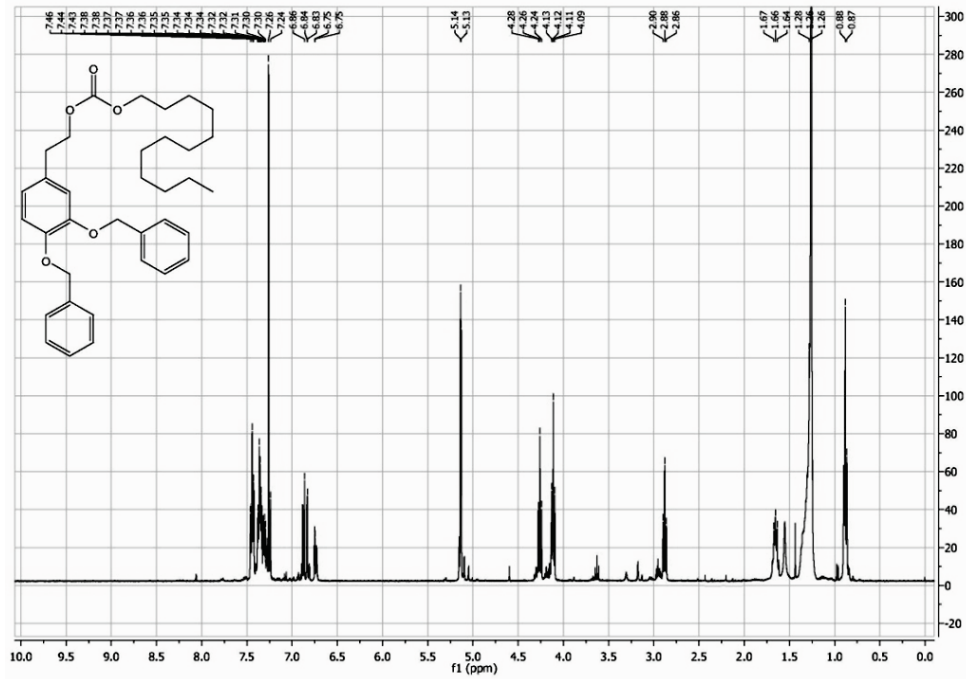
Producto 17



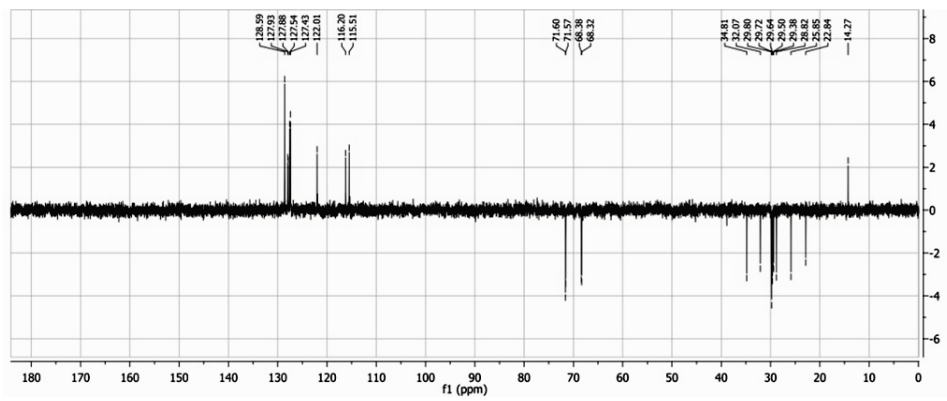
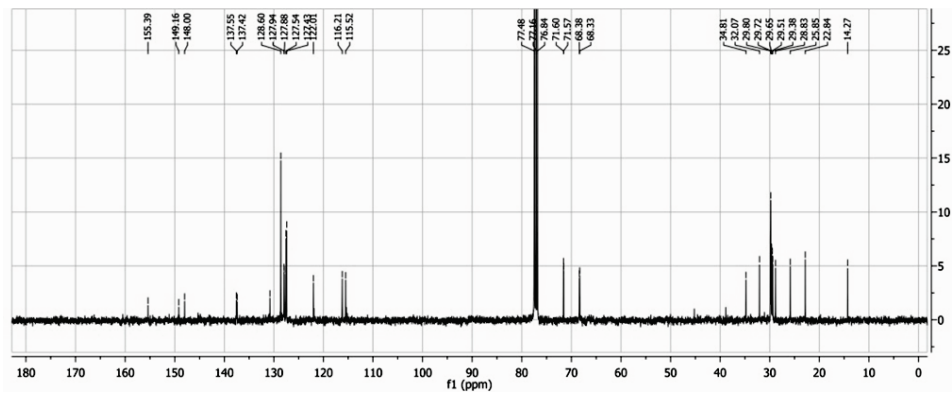
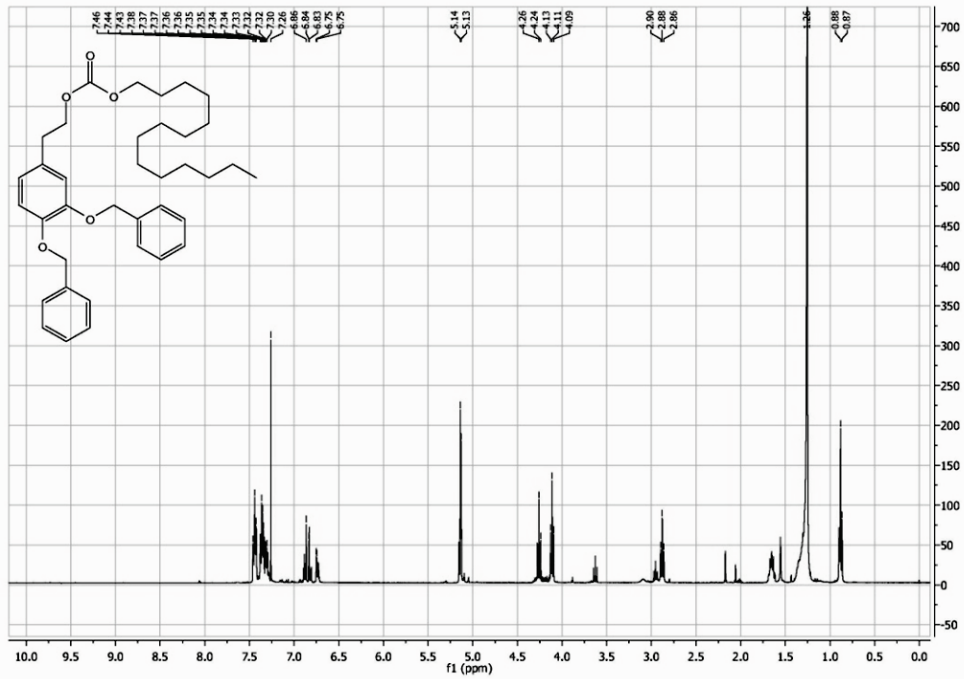
Producto 18



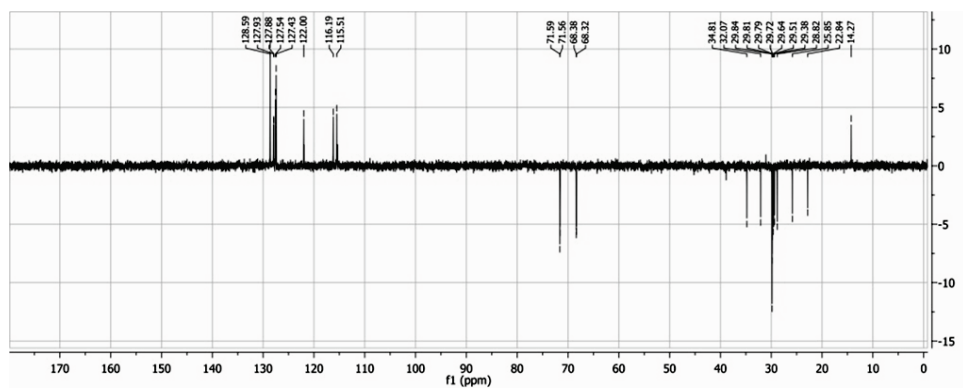
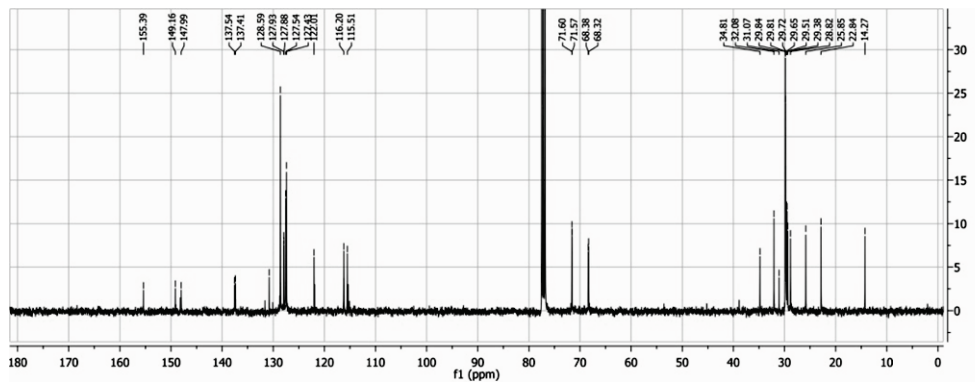
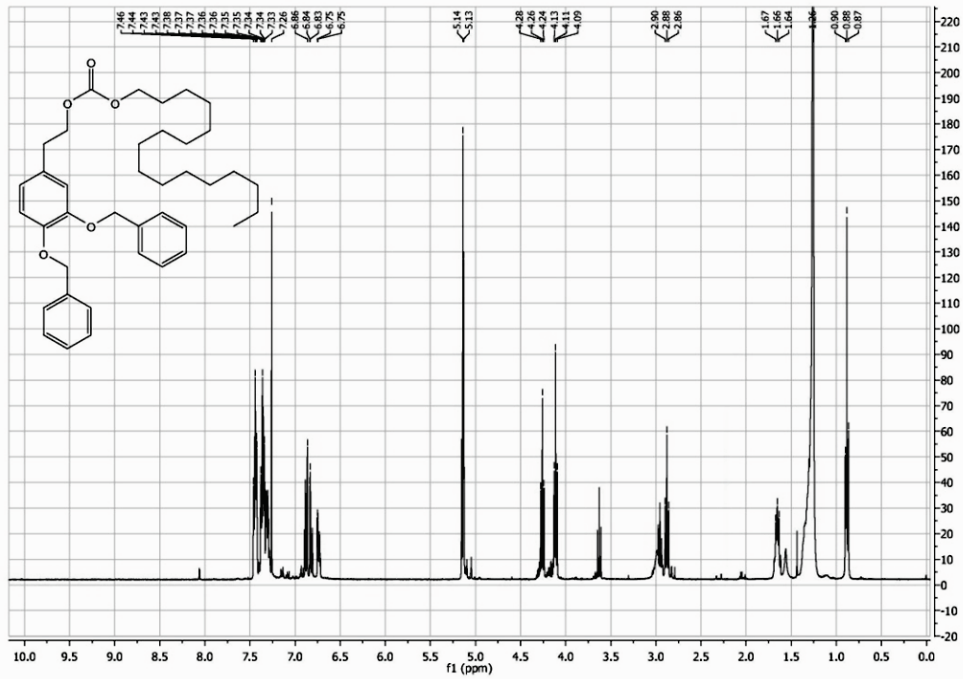
Producto 19



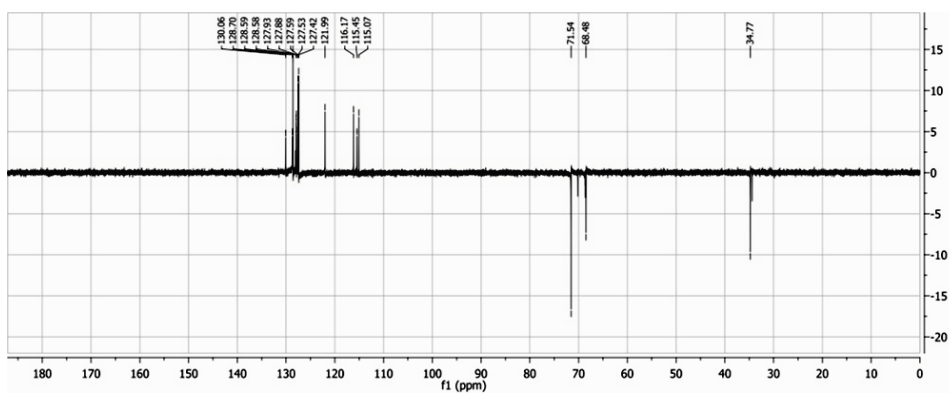
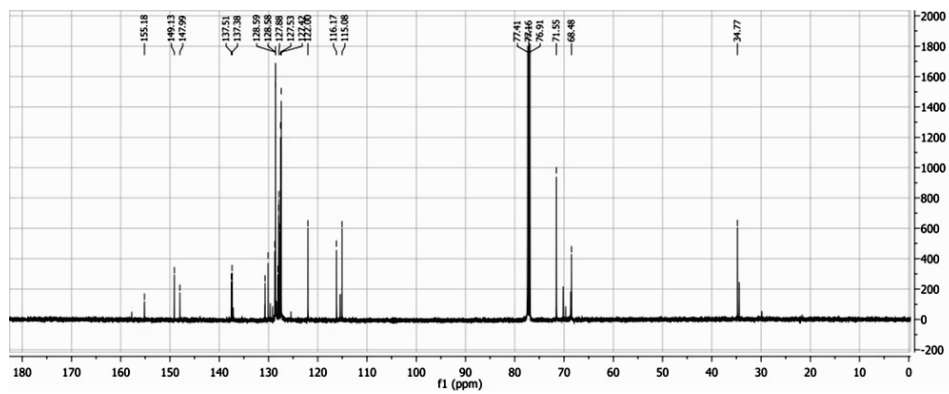
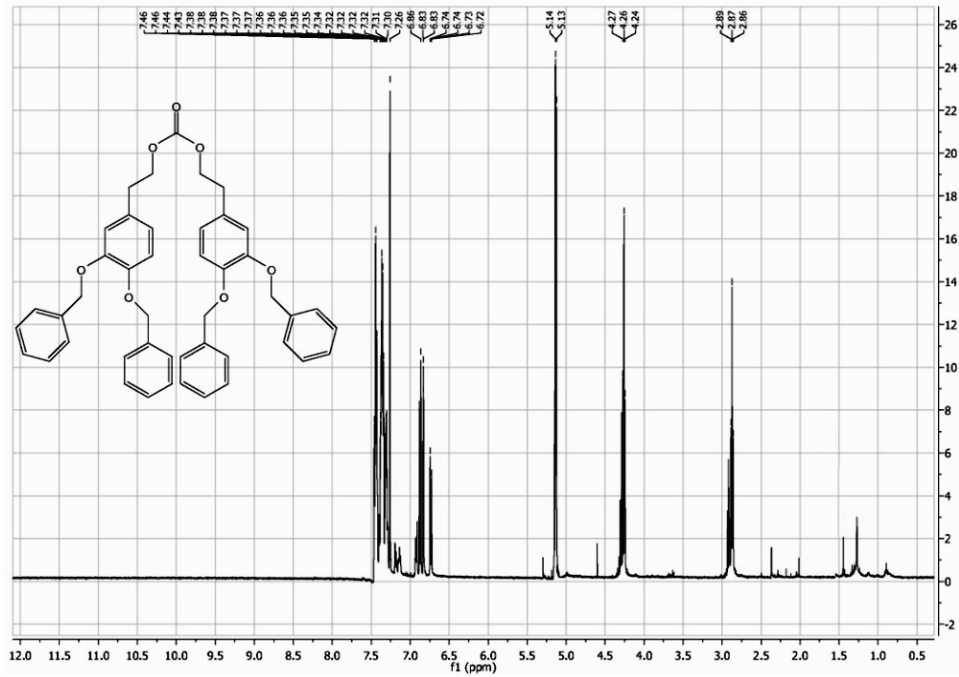
Producto 20



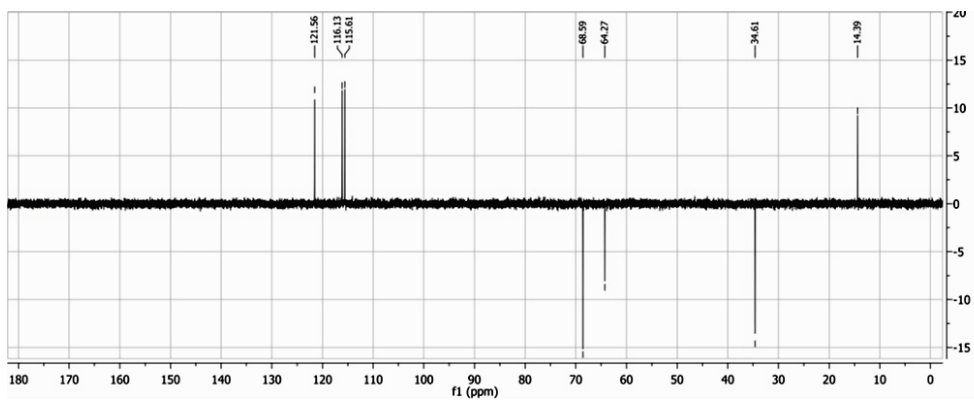
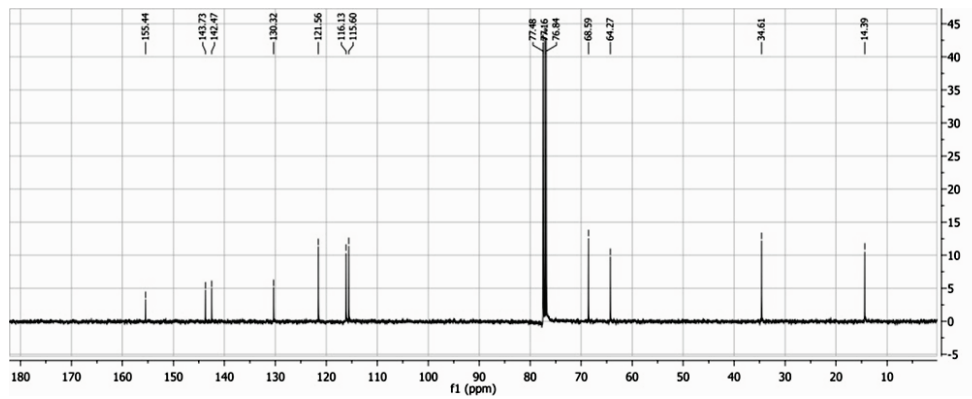
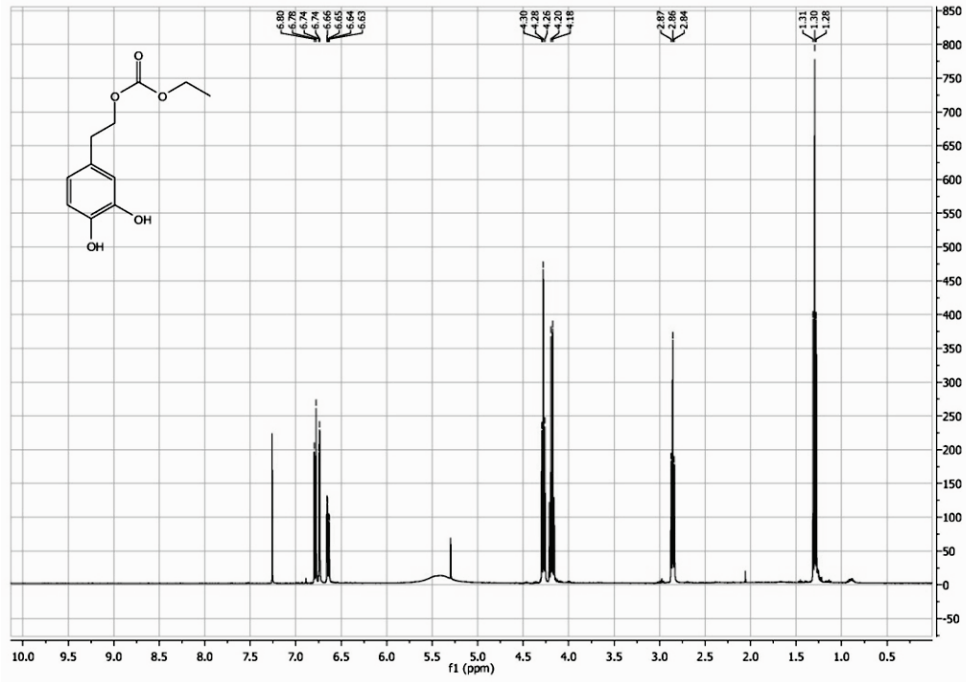
Producto 21



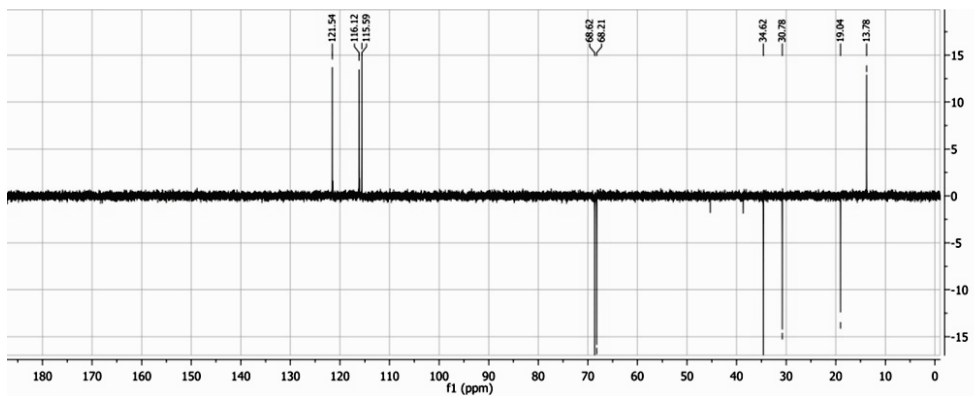
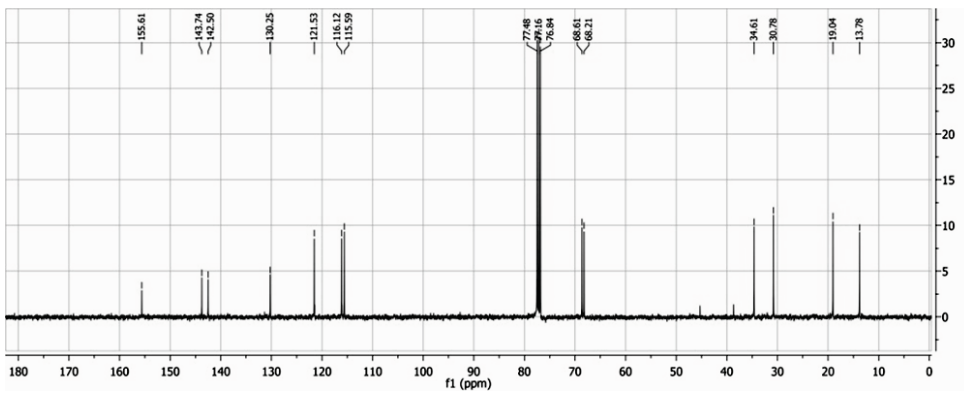
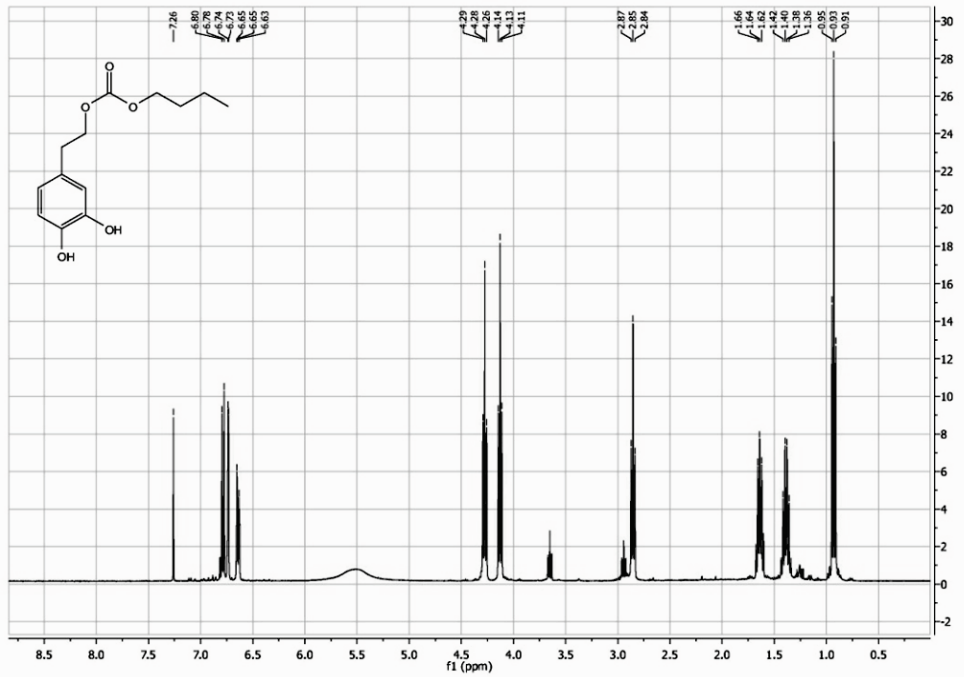
Producto 22



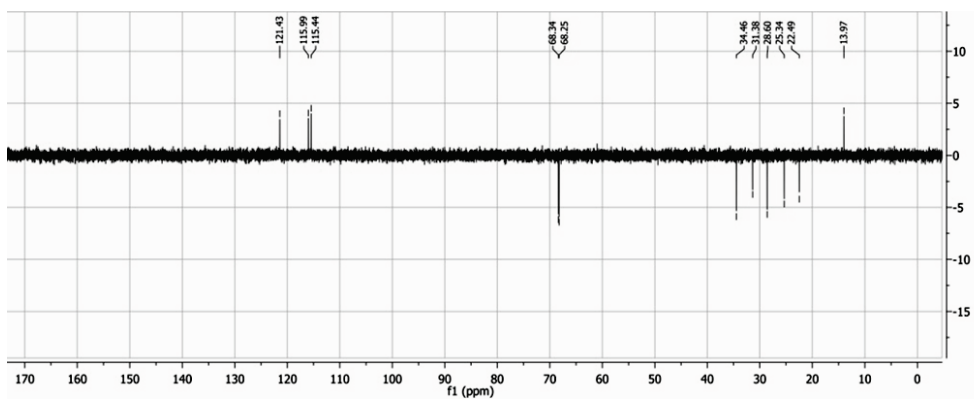
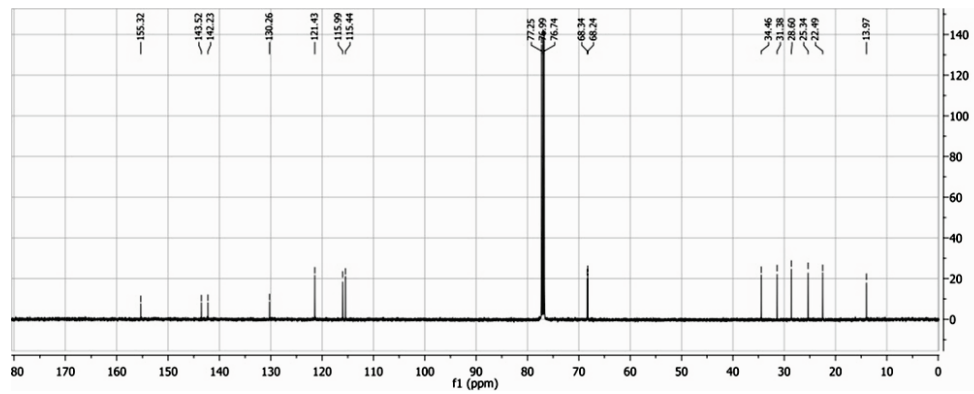
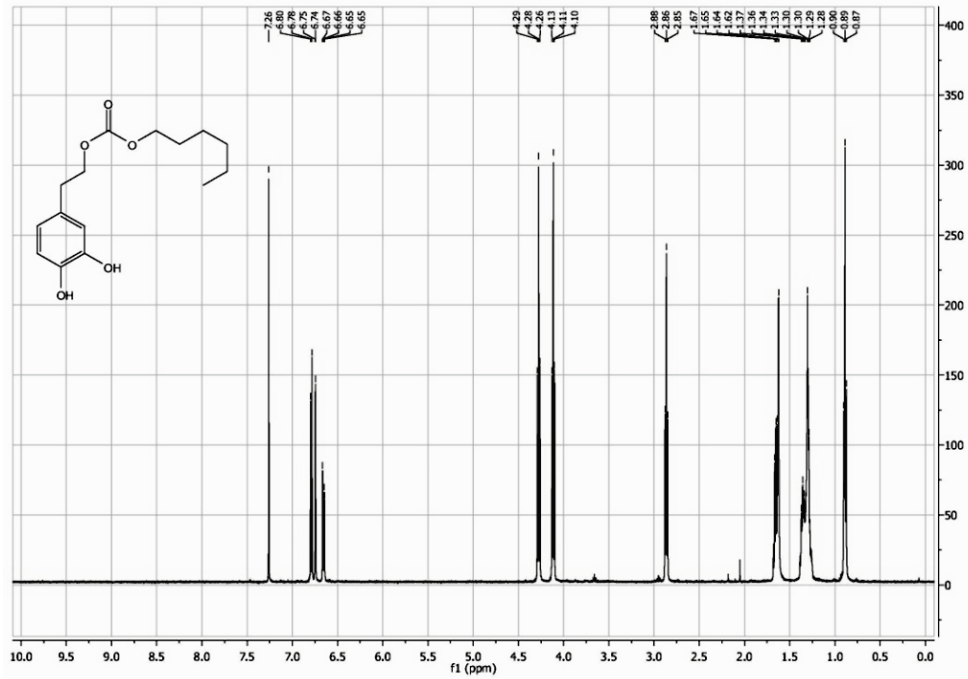
Producto 23



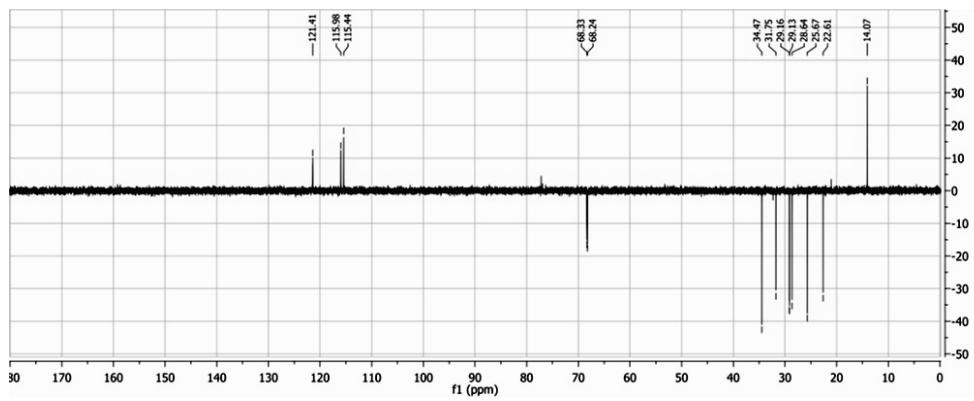
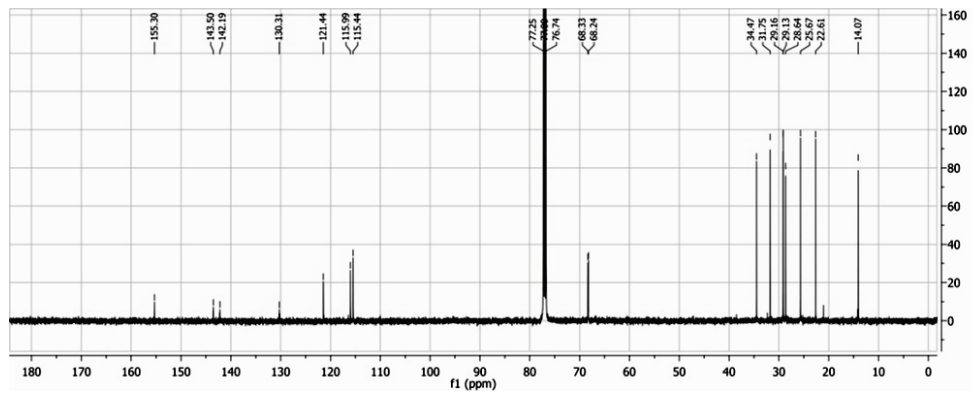
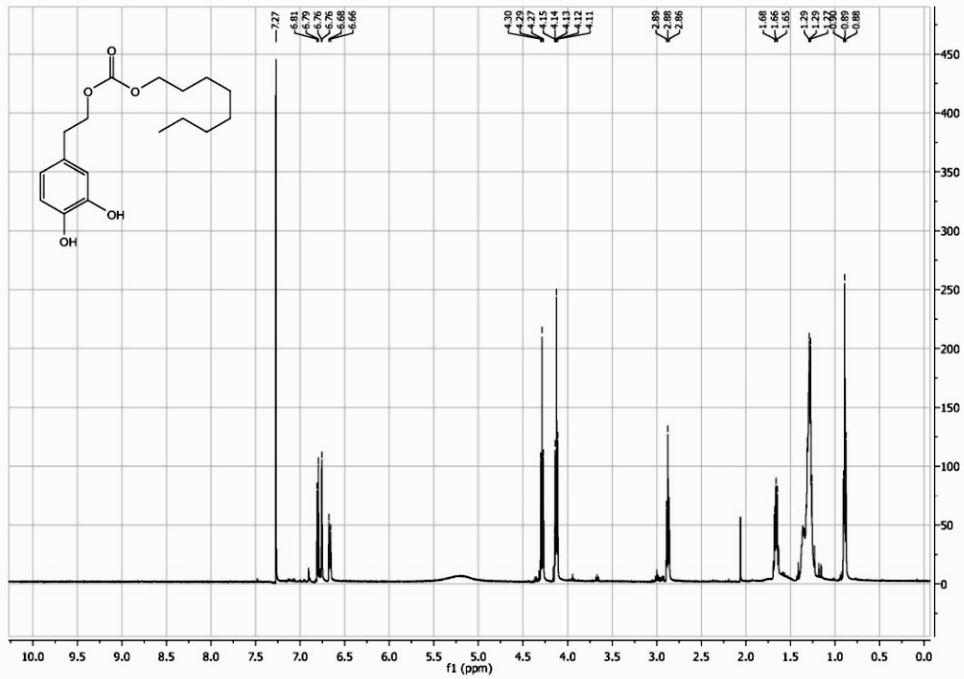
Producto 24



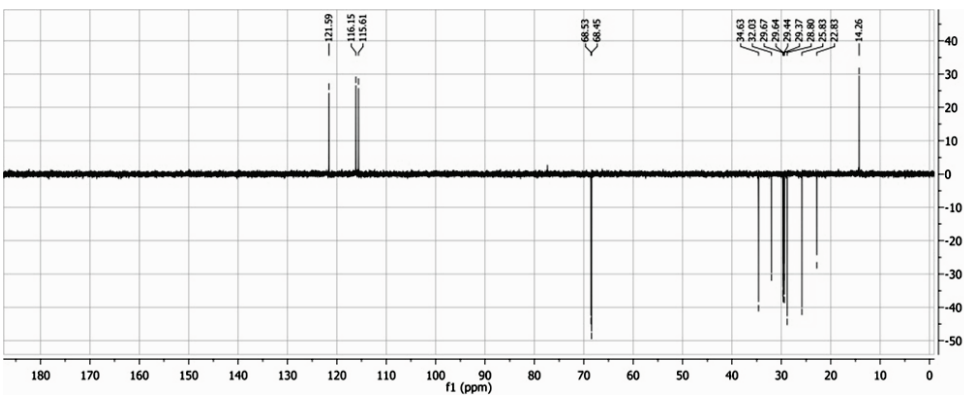
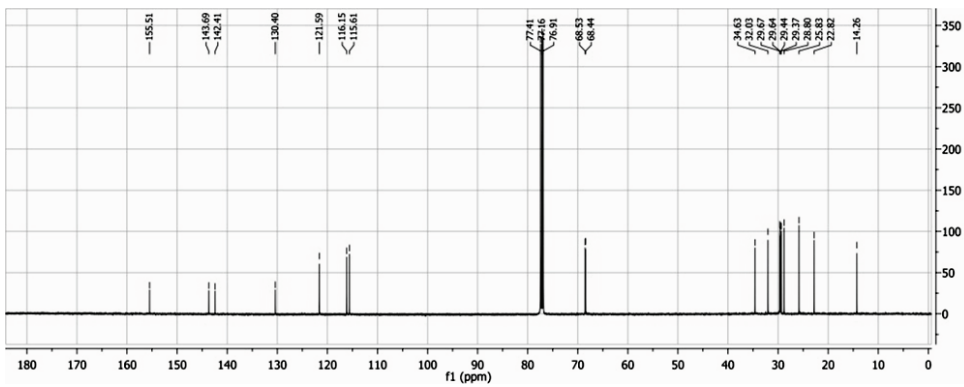
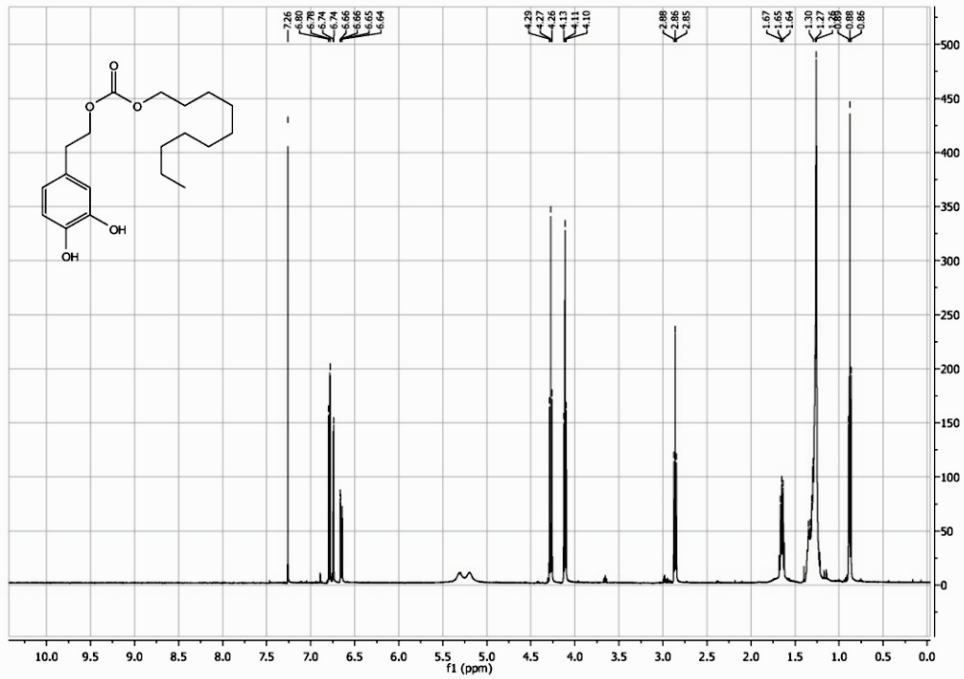
Producto 25



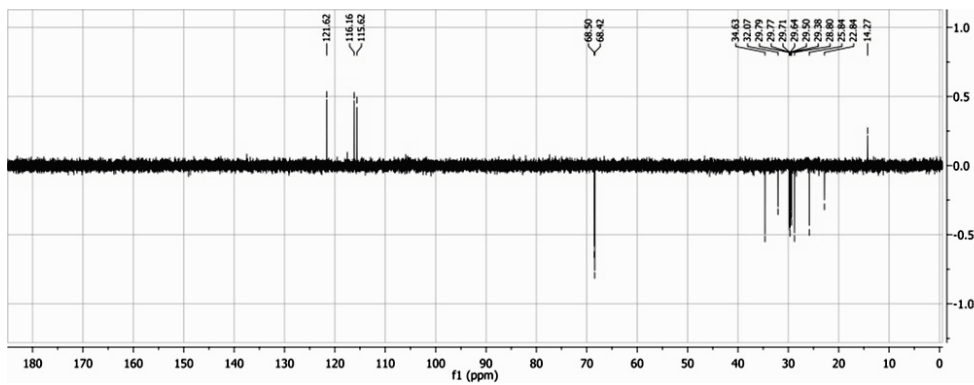
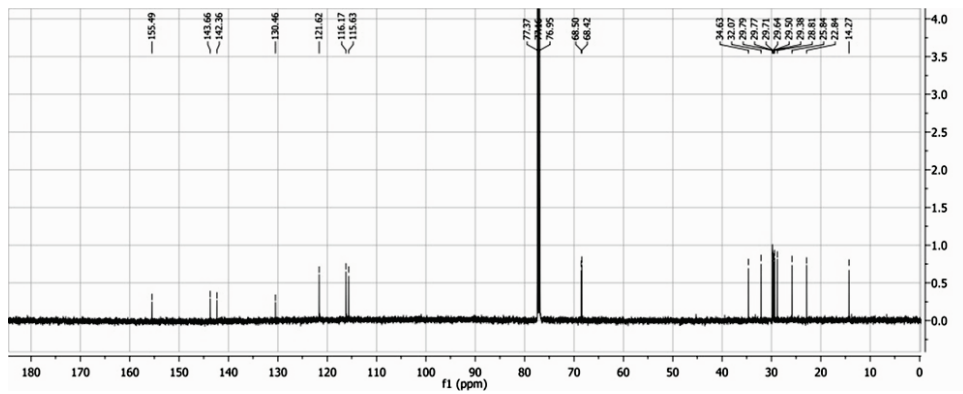
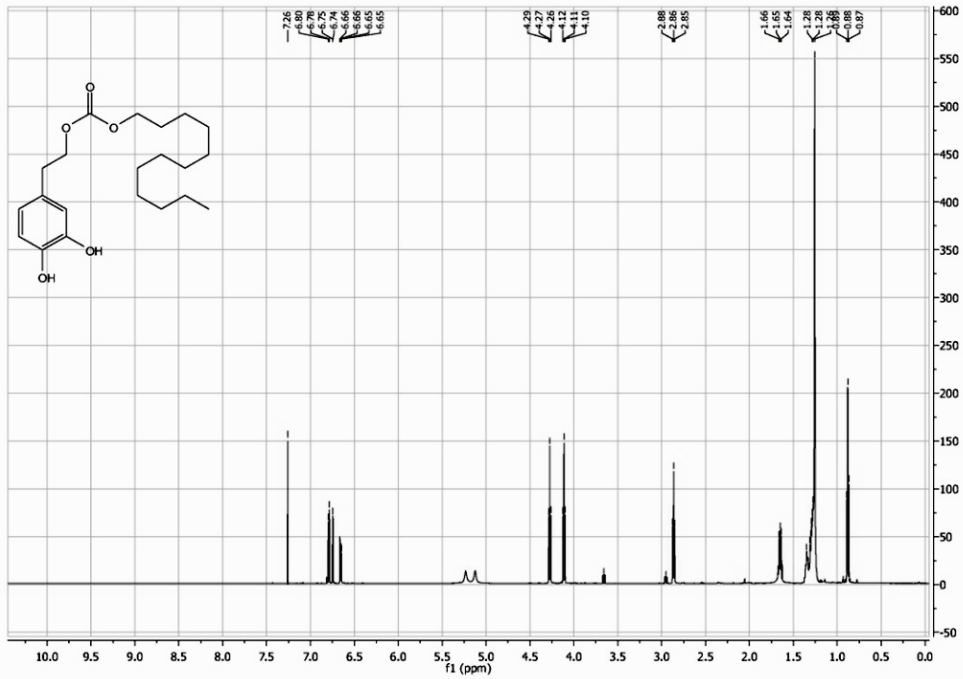
Producto 26



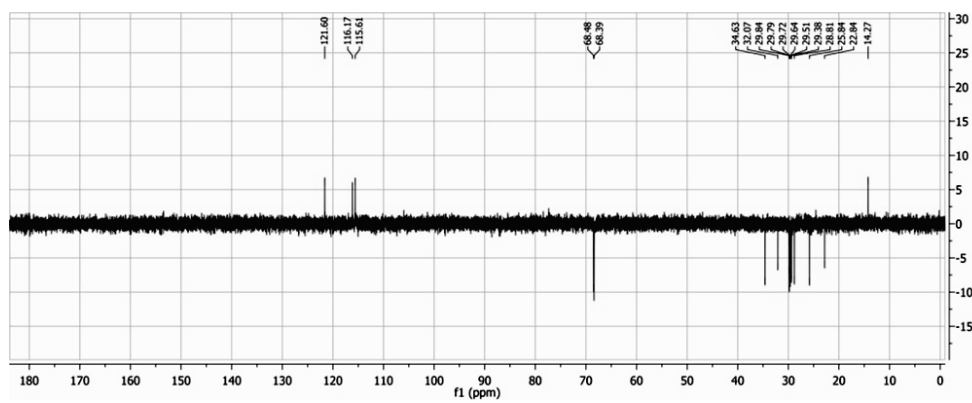
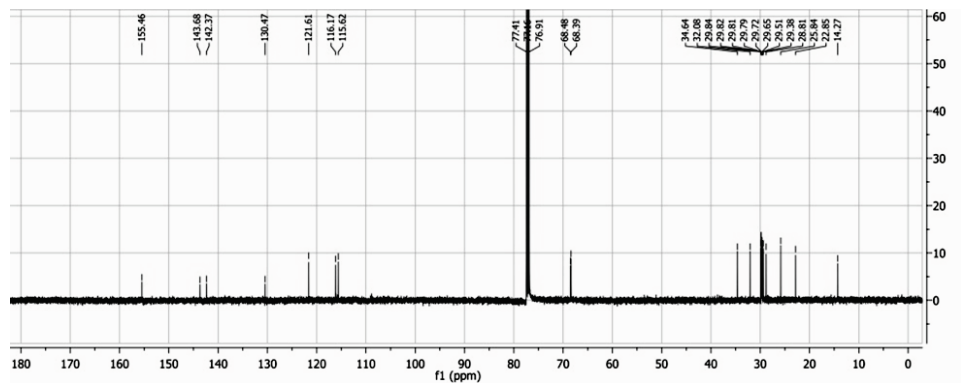
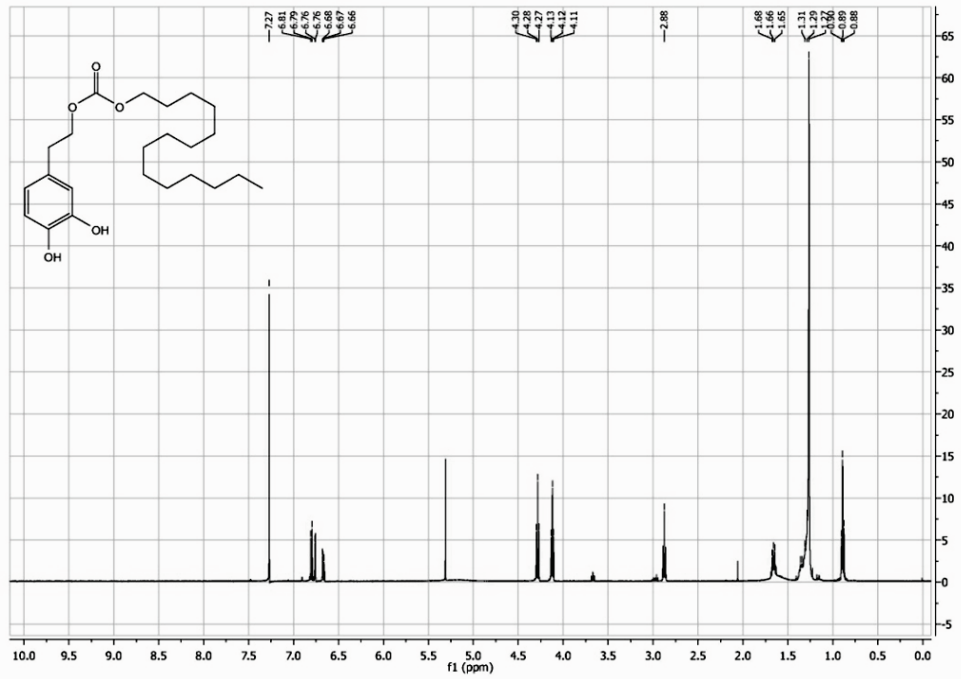
Producto 27



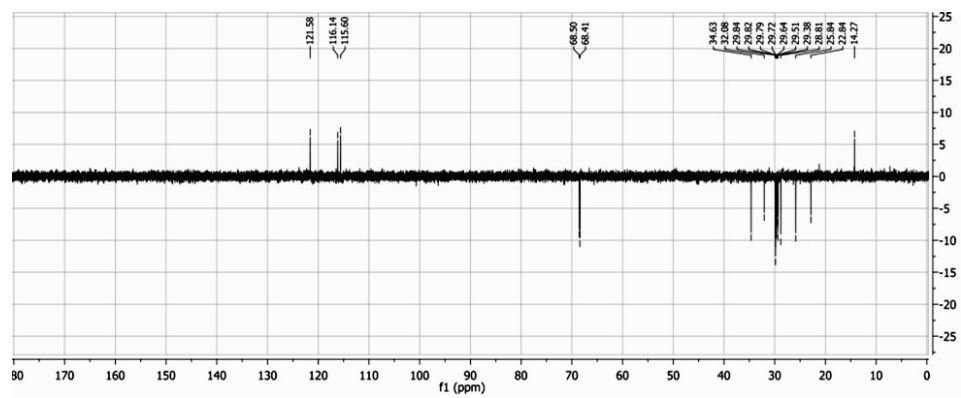
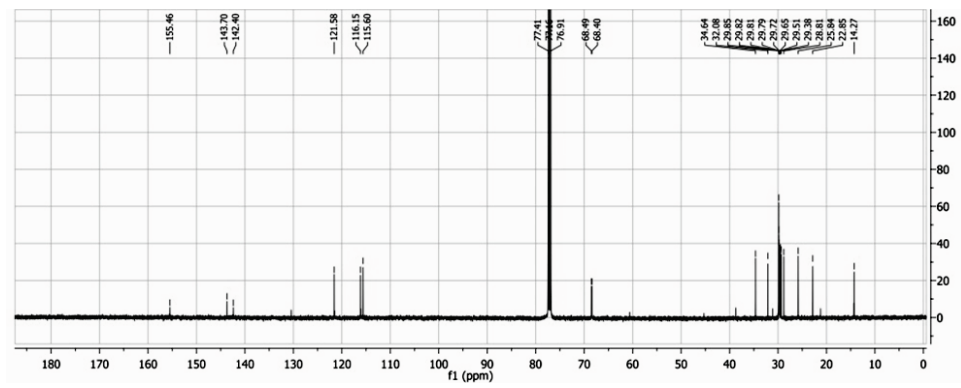
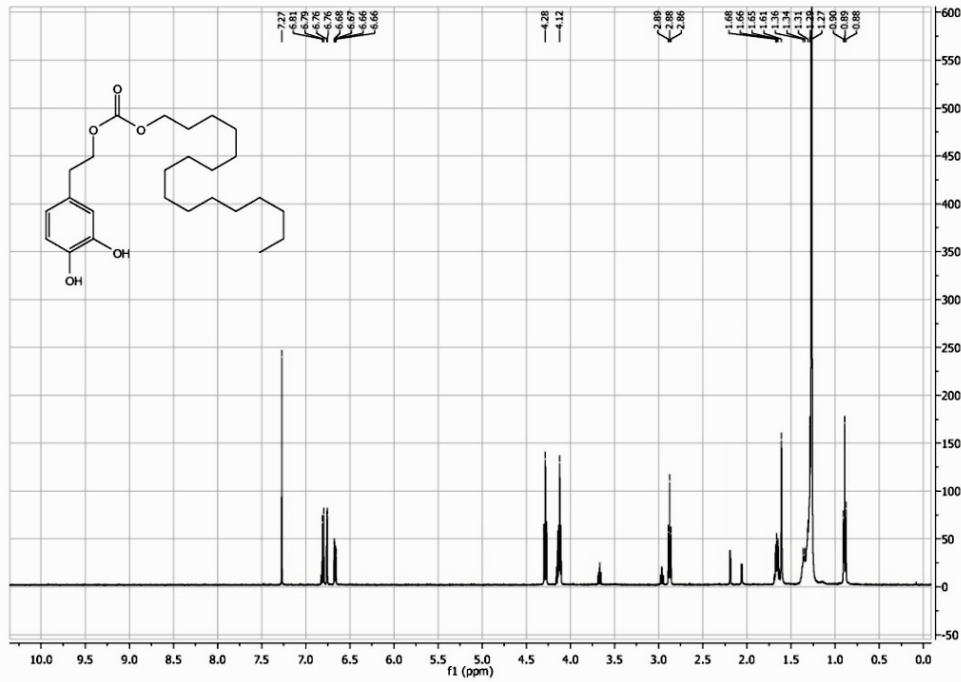
Producto 28



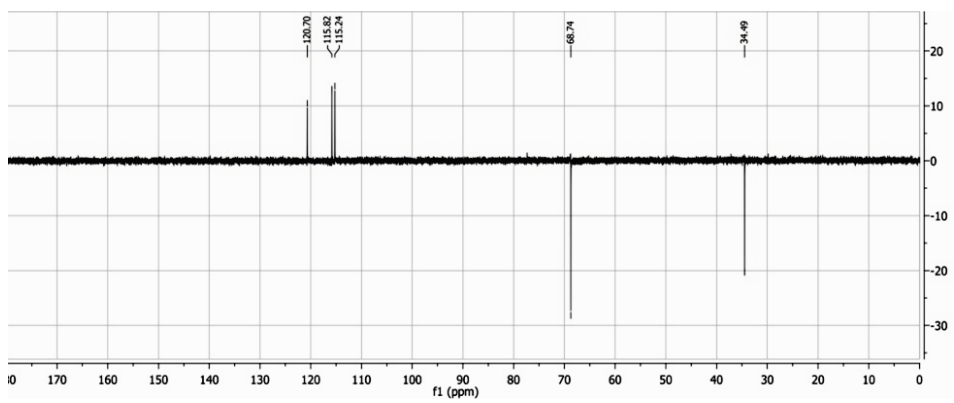
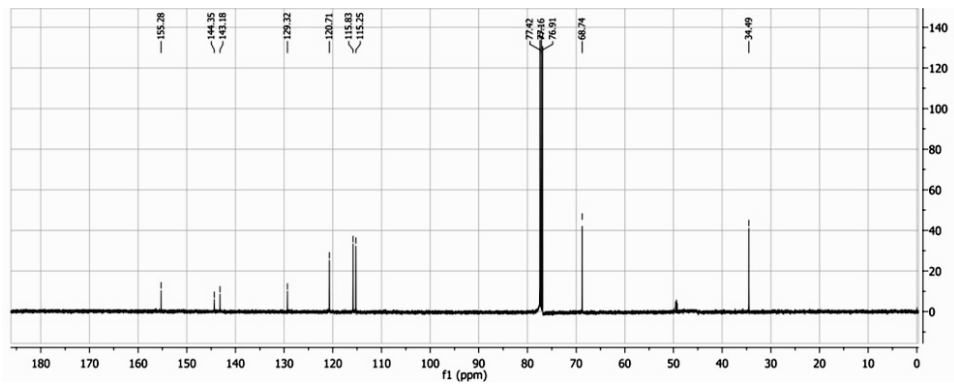
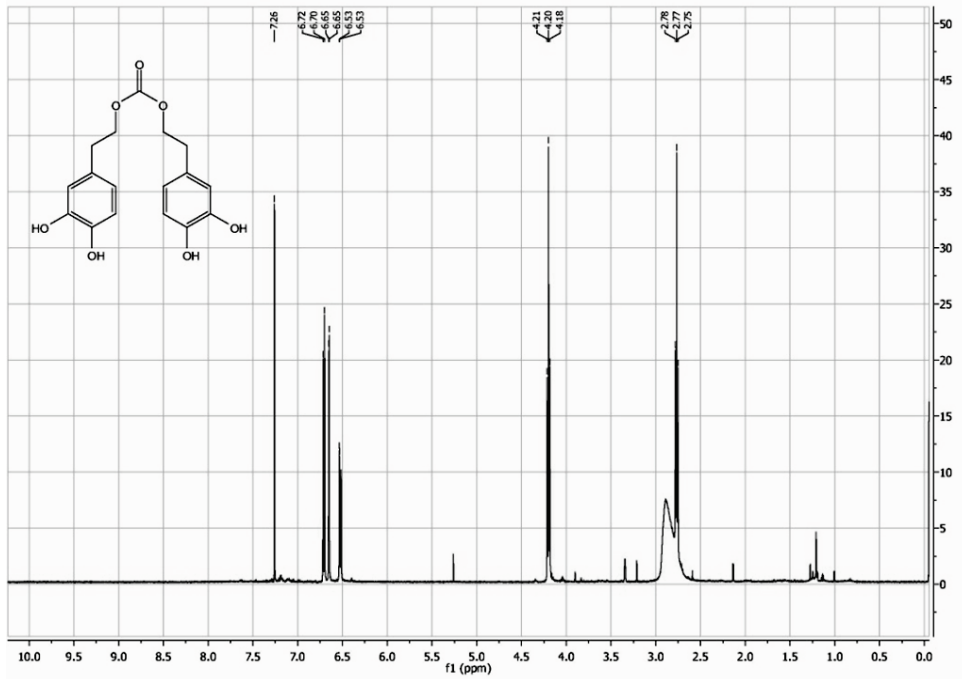
Producto 29



Producto 30

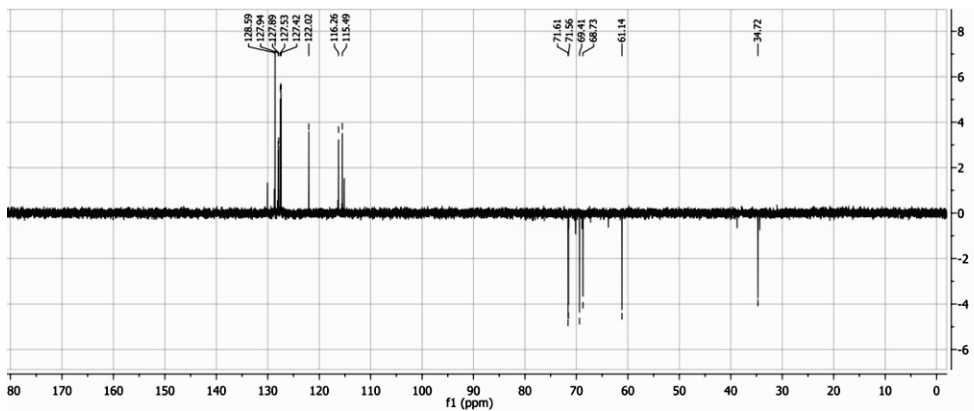
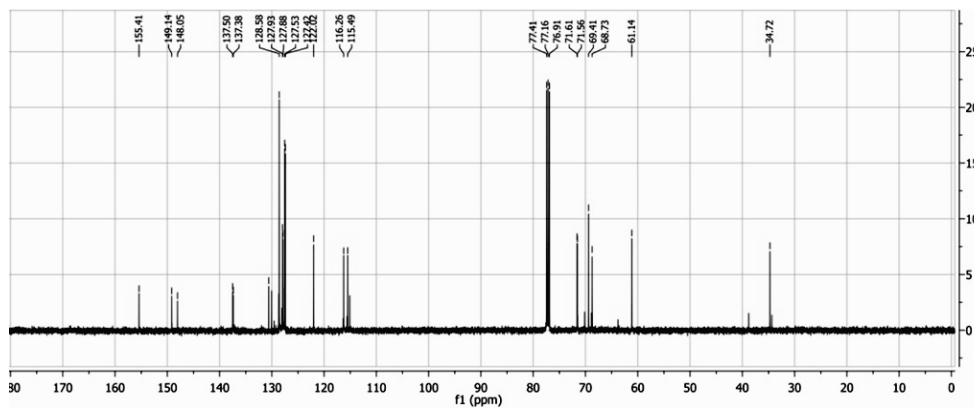
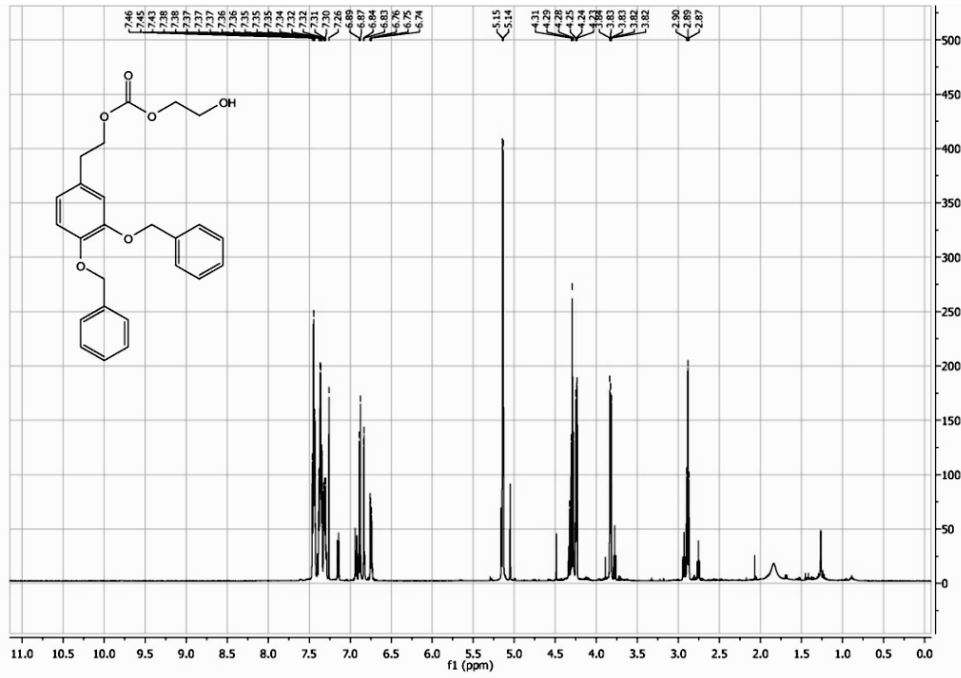


Producto 31



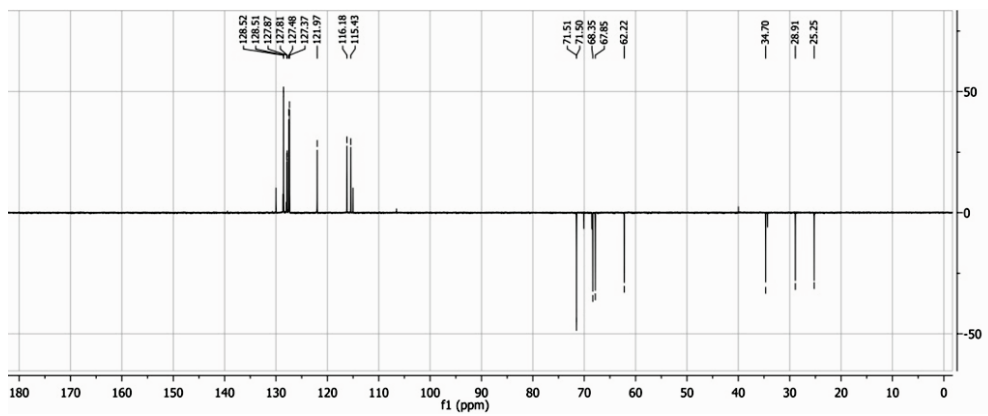
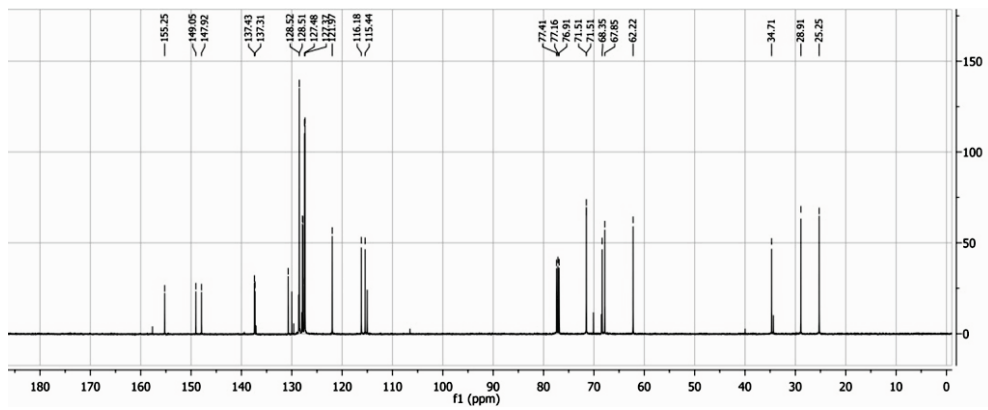
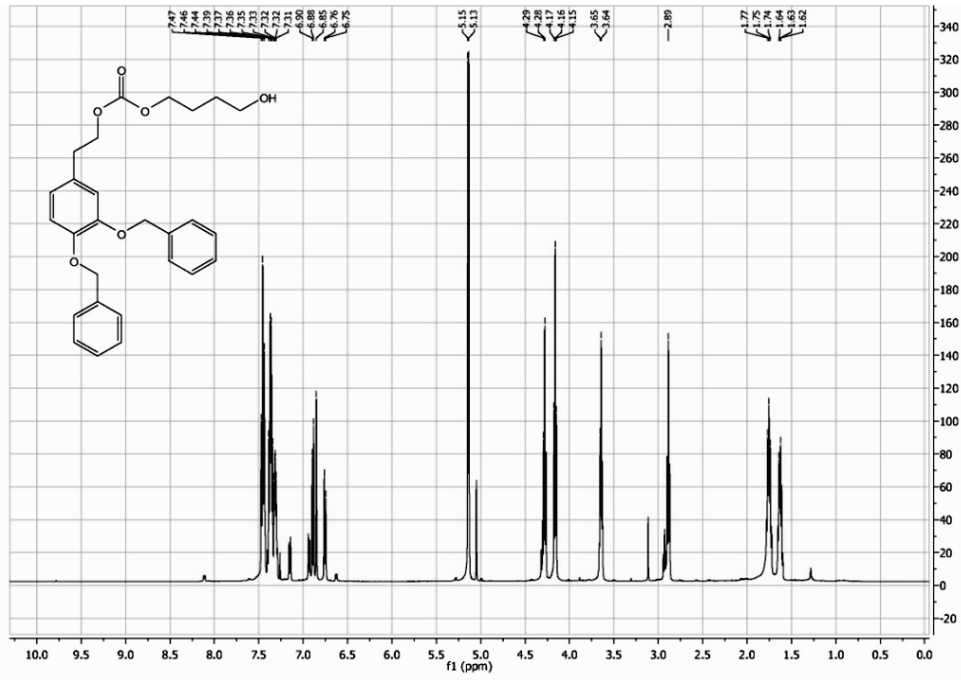
7.3. ESPECTROS RMN PUBLICACIÓN 4

Producto 4a

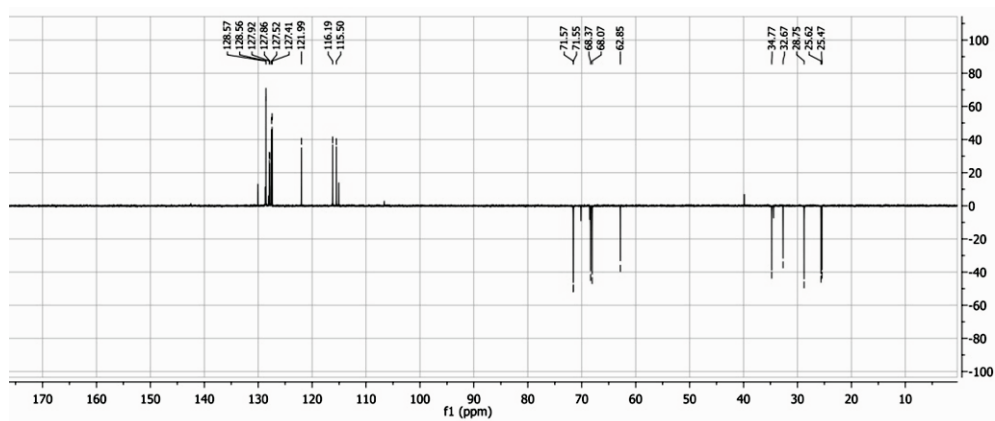
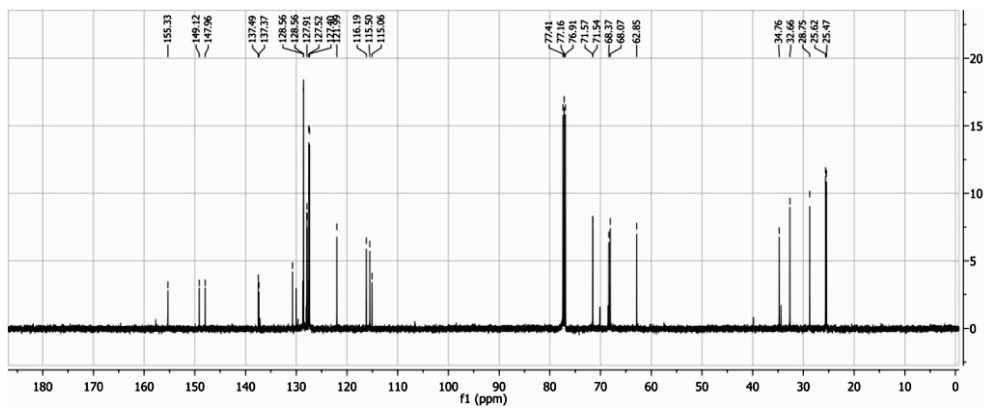
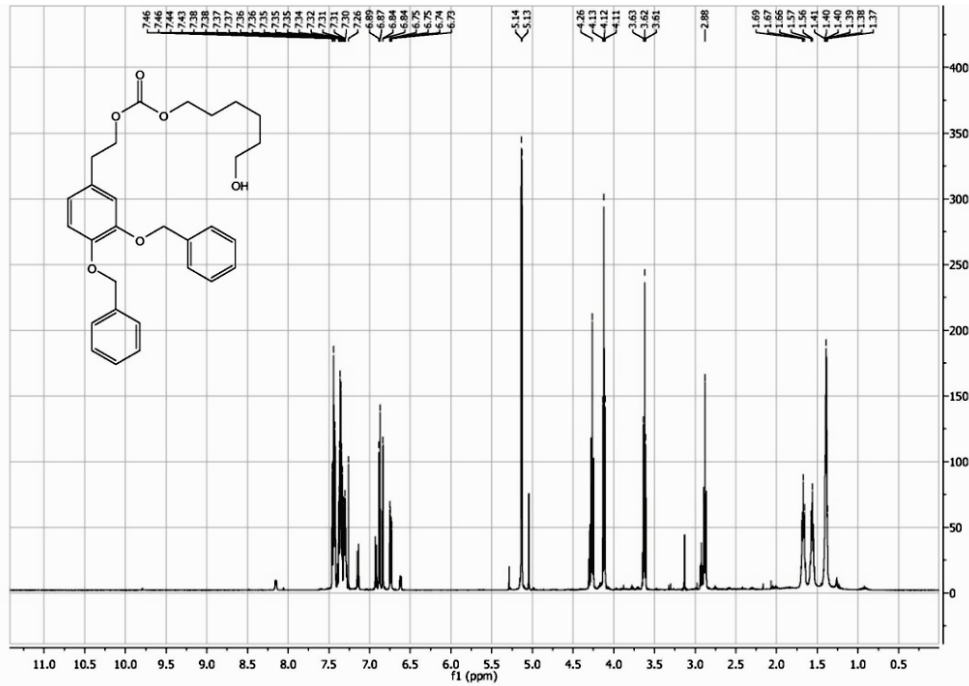


CAPÍTULO 7. ESPECTROS RMN

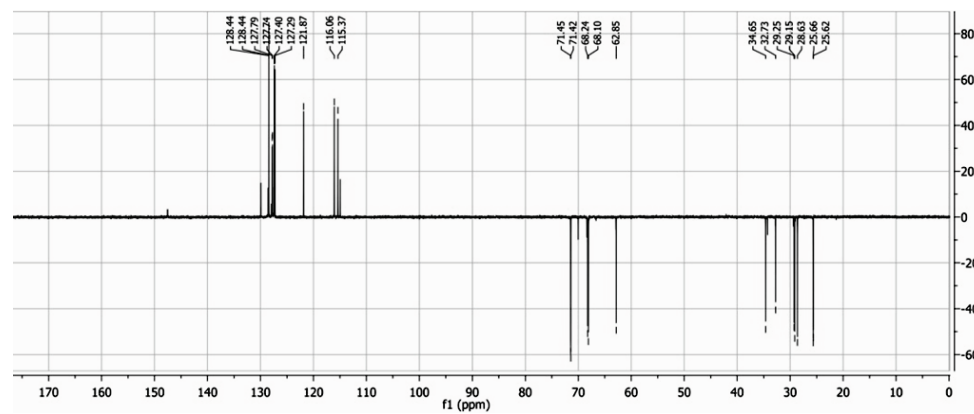
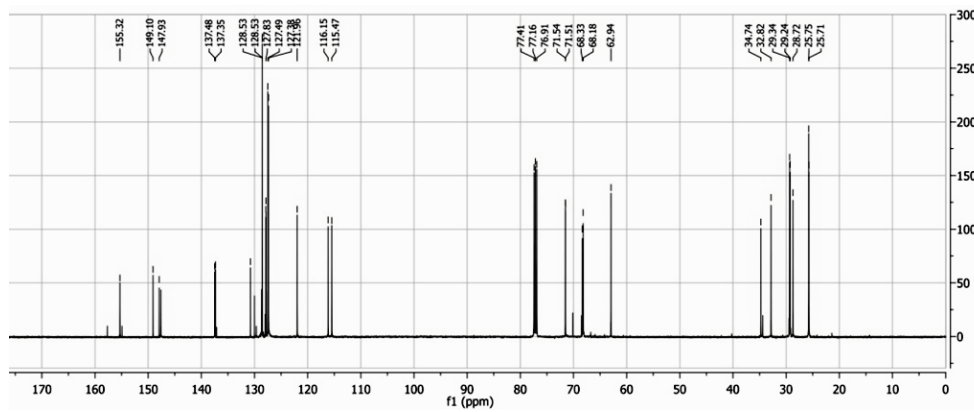
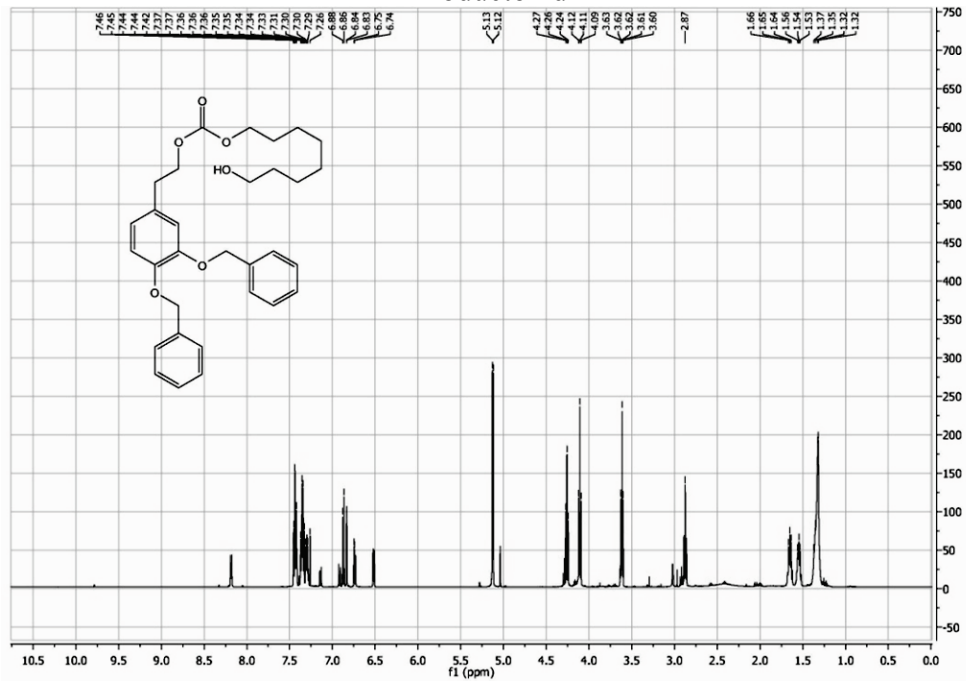
Producto 4b

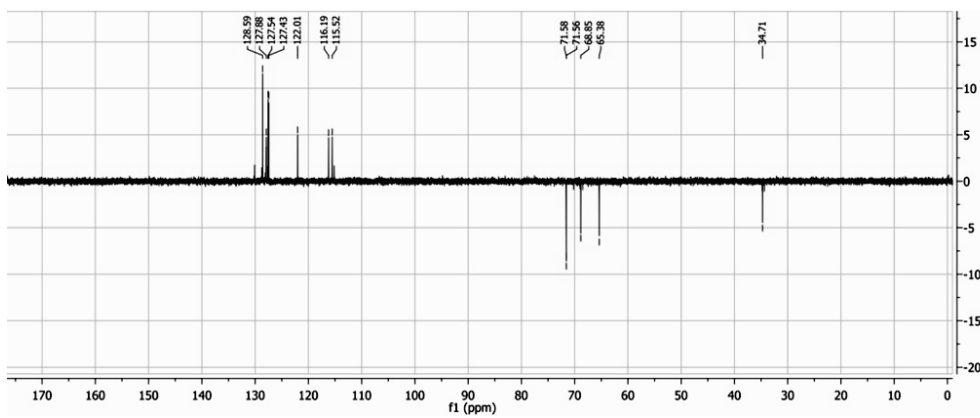
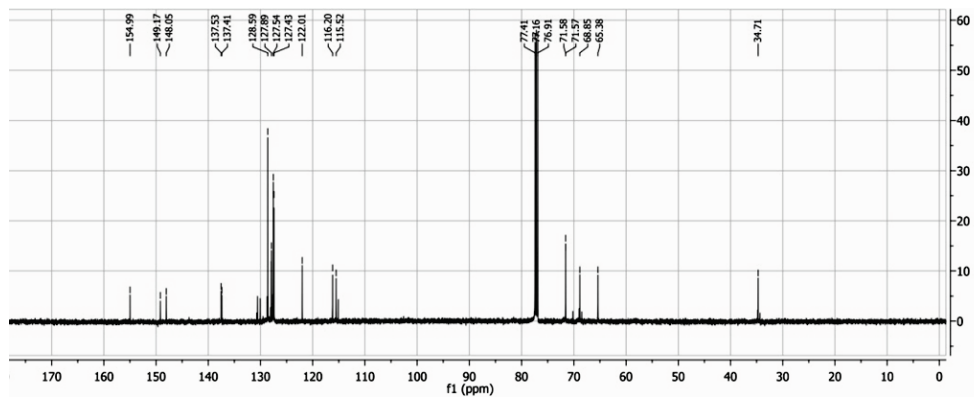
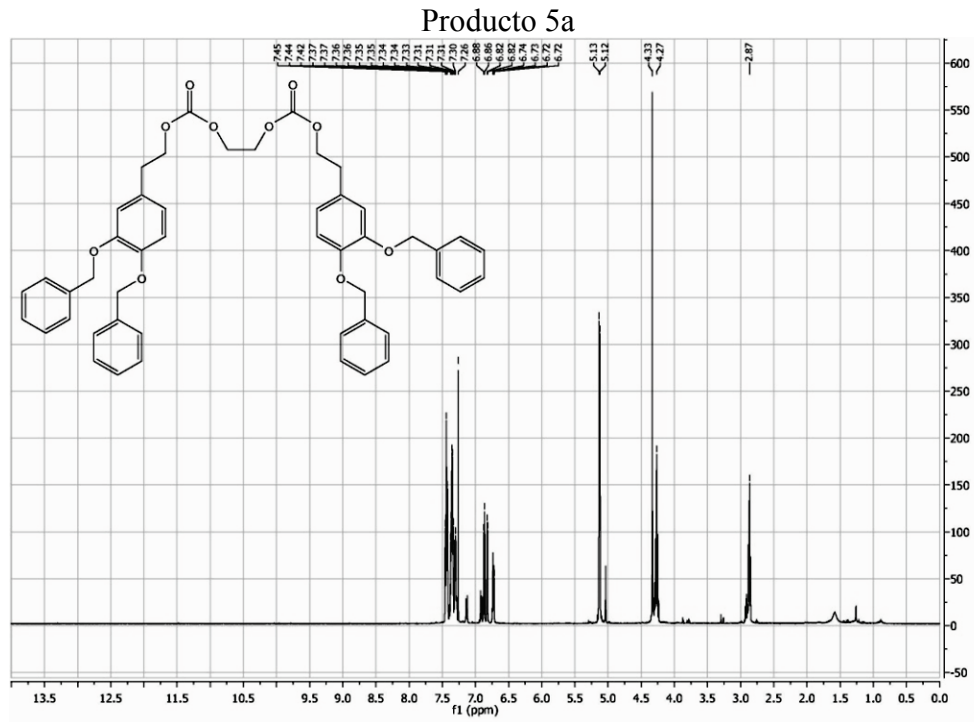


Producto 4c

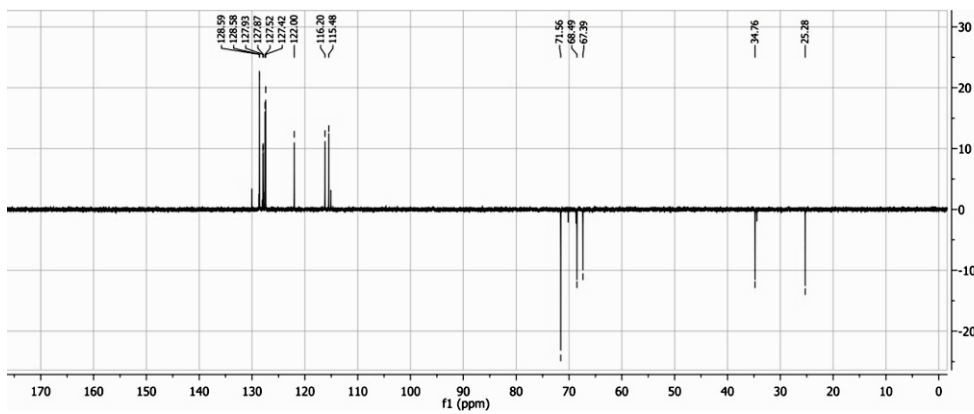
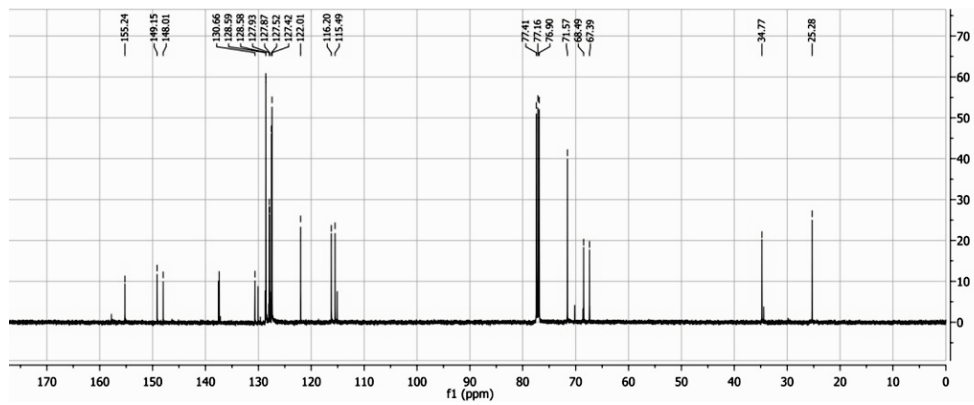
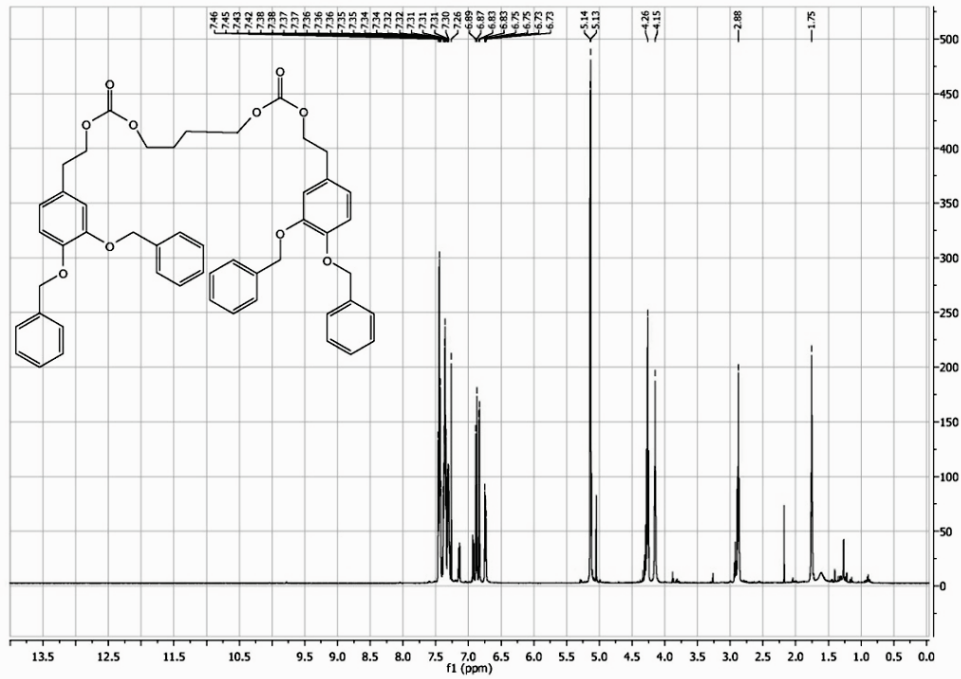


Producto 4d

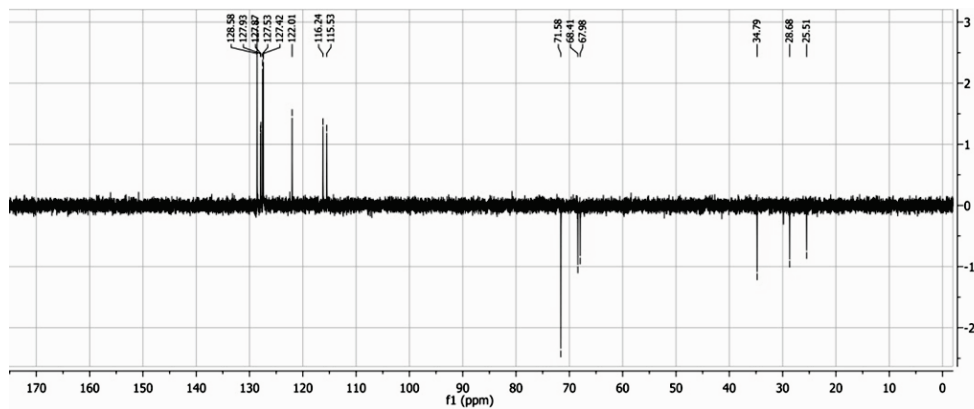
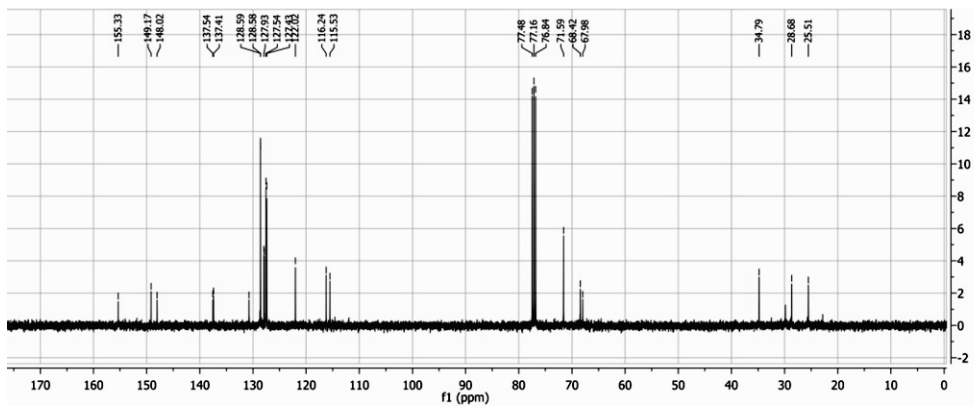
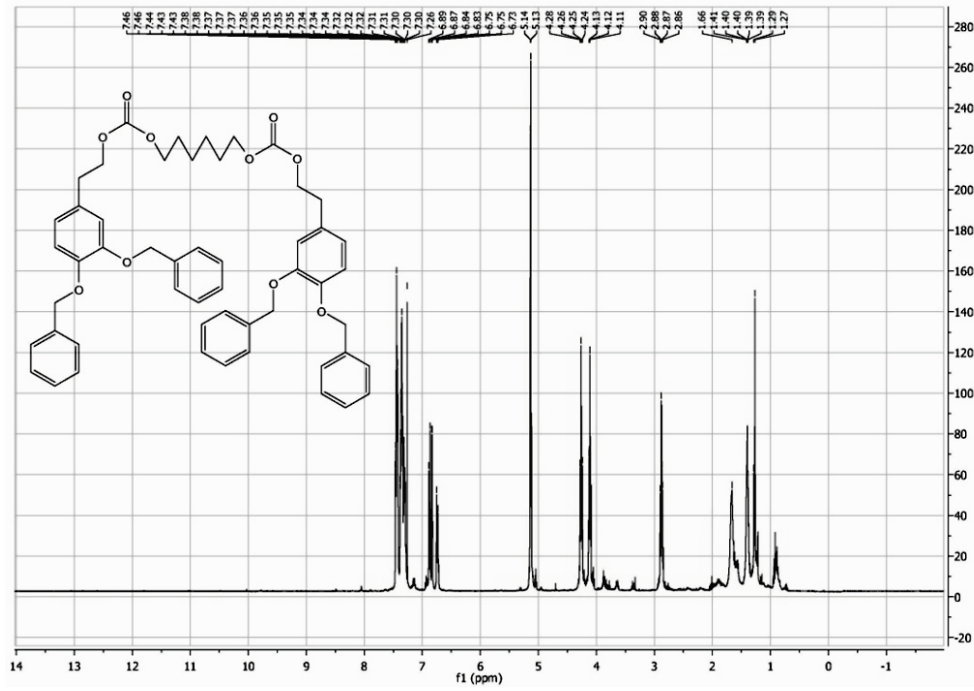




Producto 5b

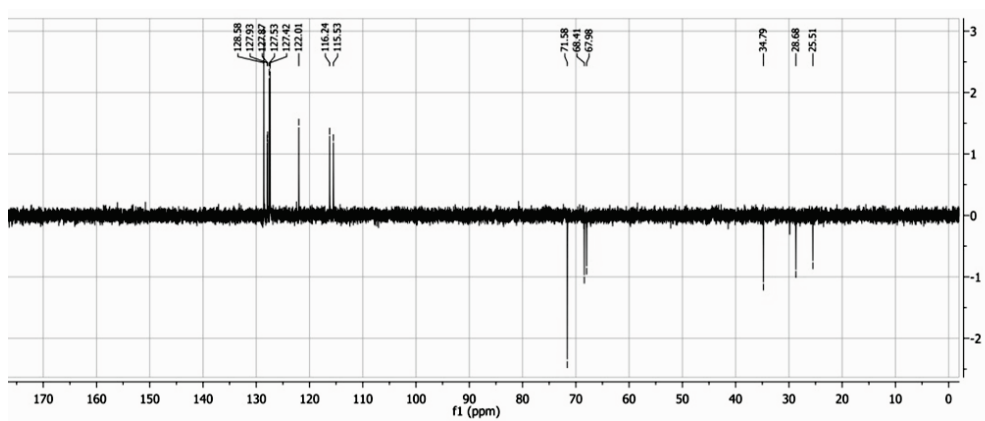
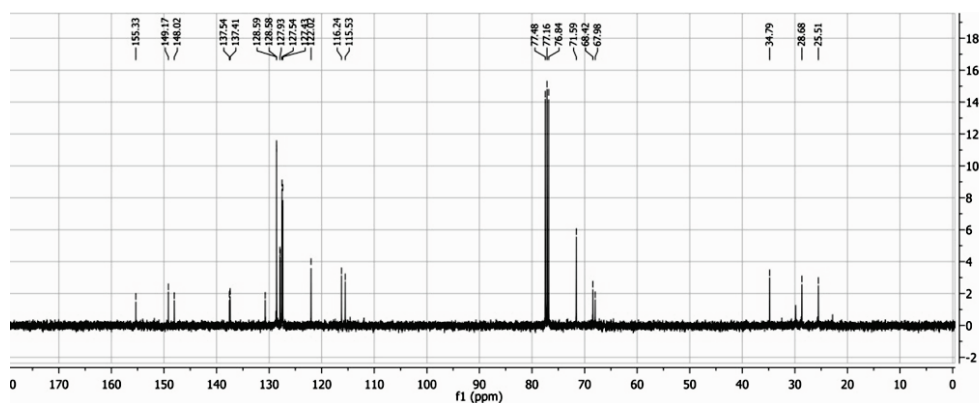
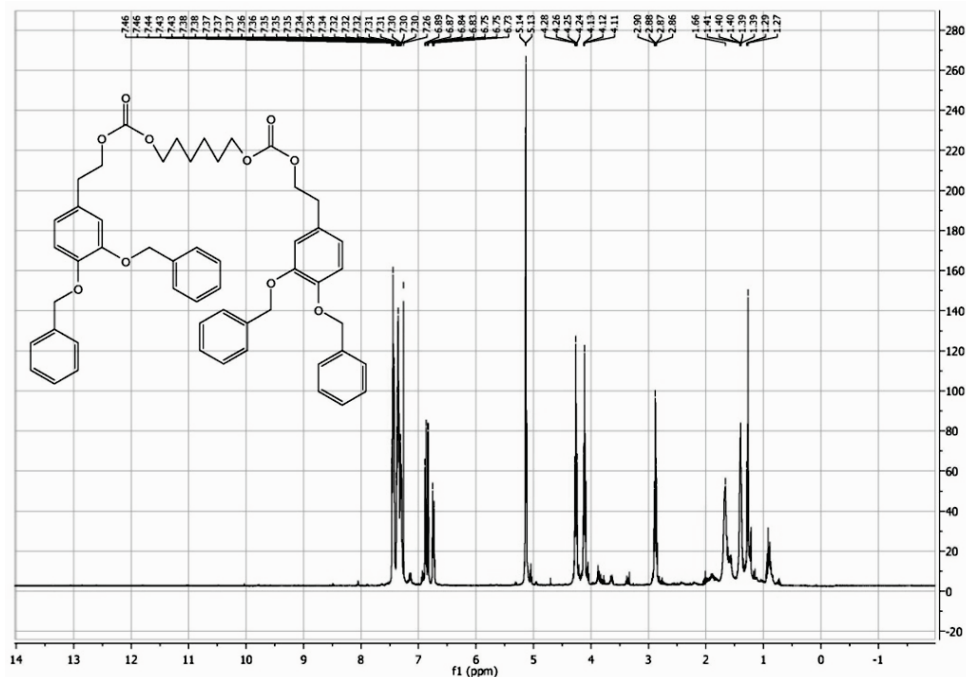


Producto 5c

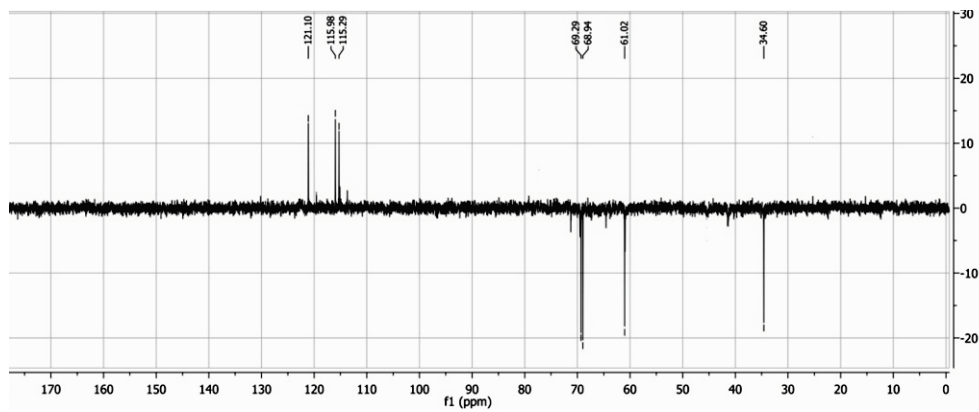
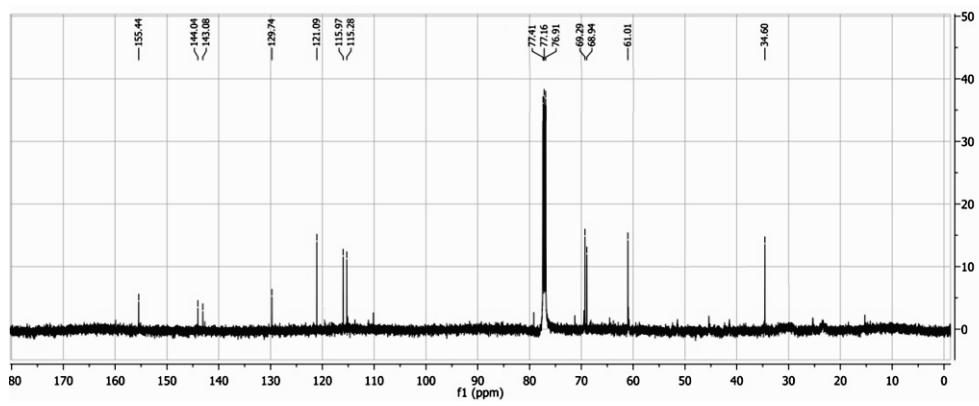
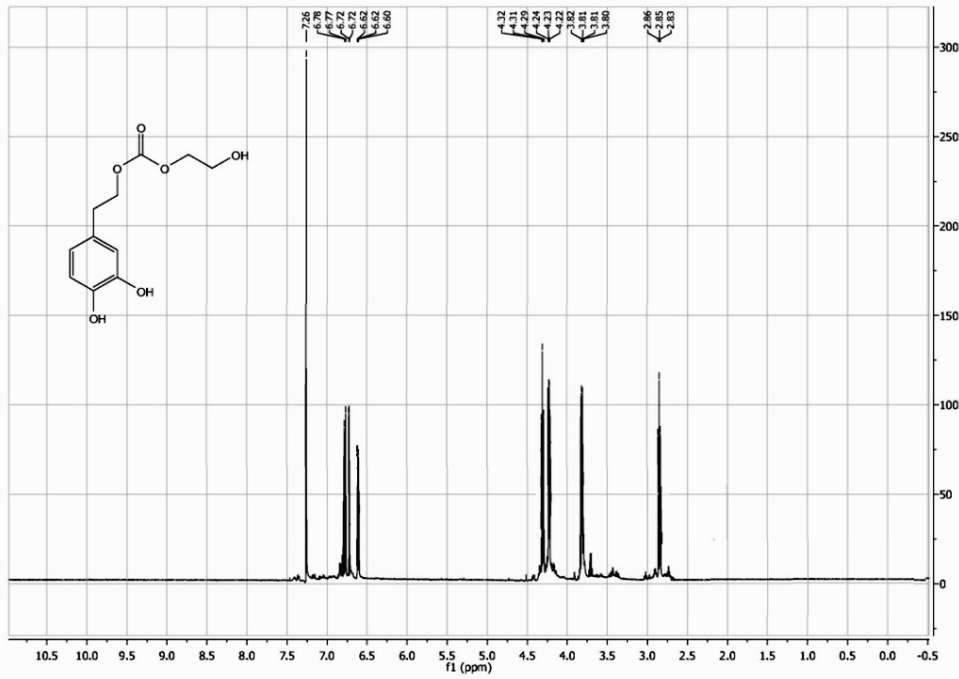


CAPÍTULO 7. ESPECTROS RMN

Producto 5d

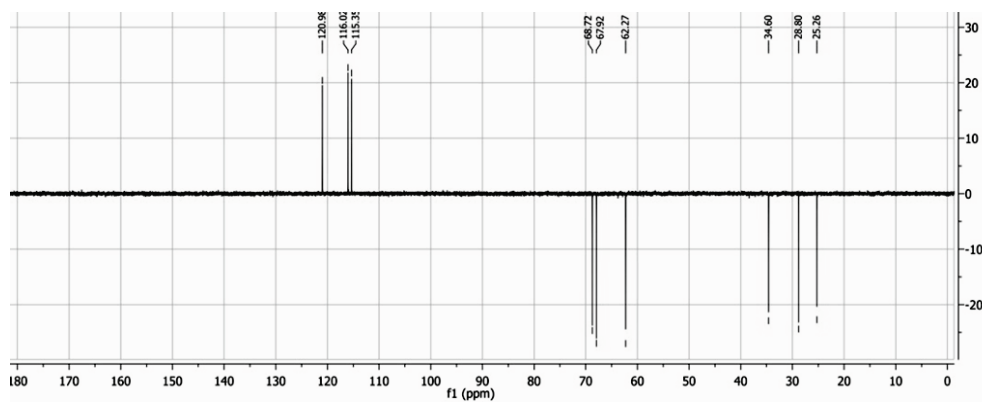
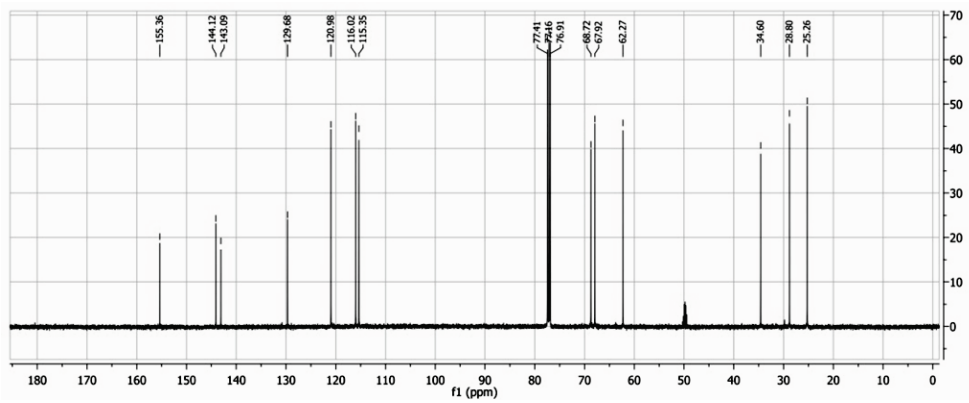
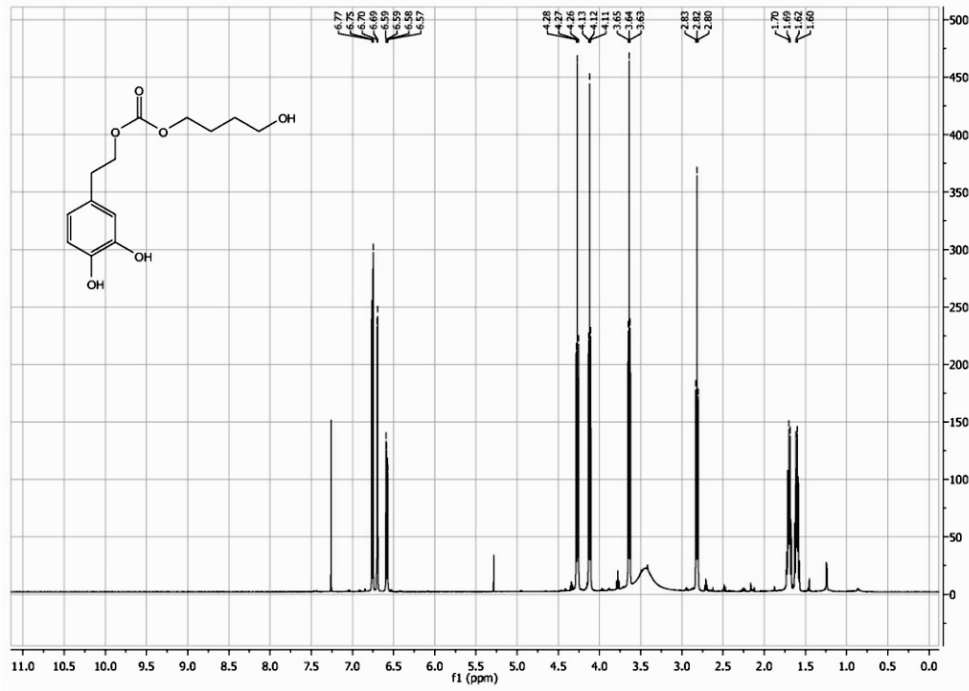


Producto 6a

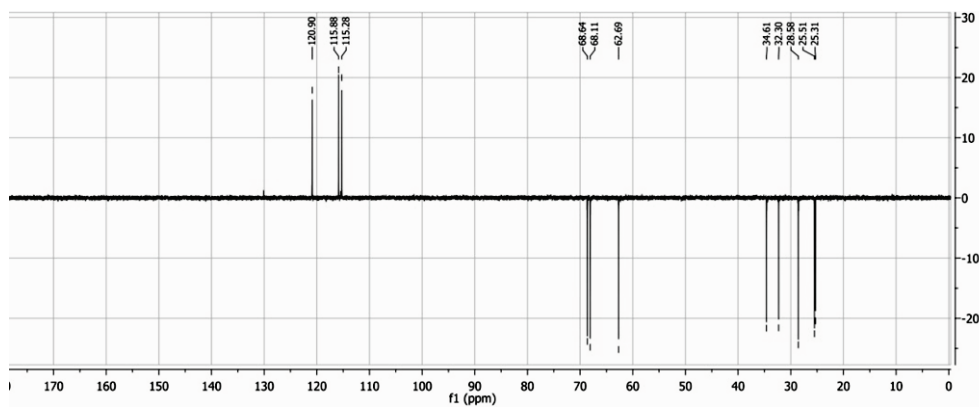
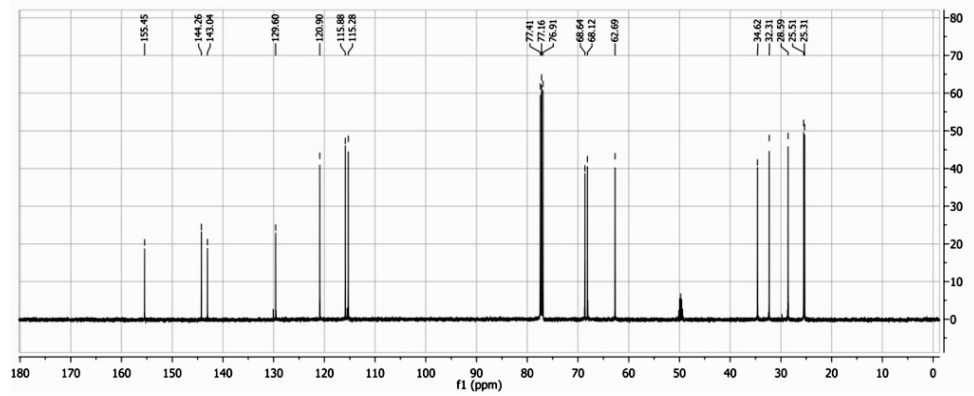
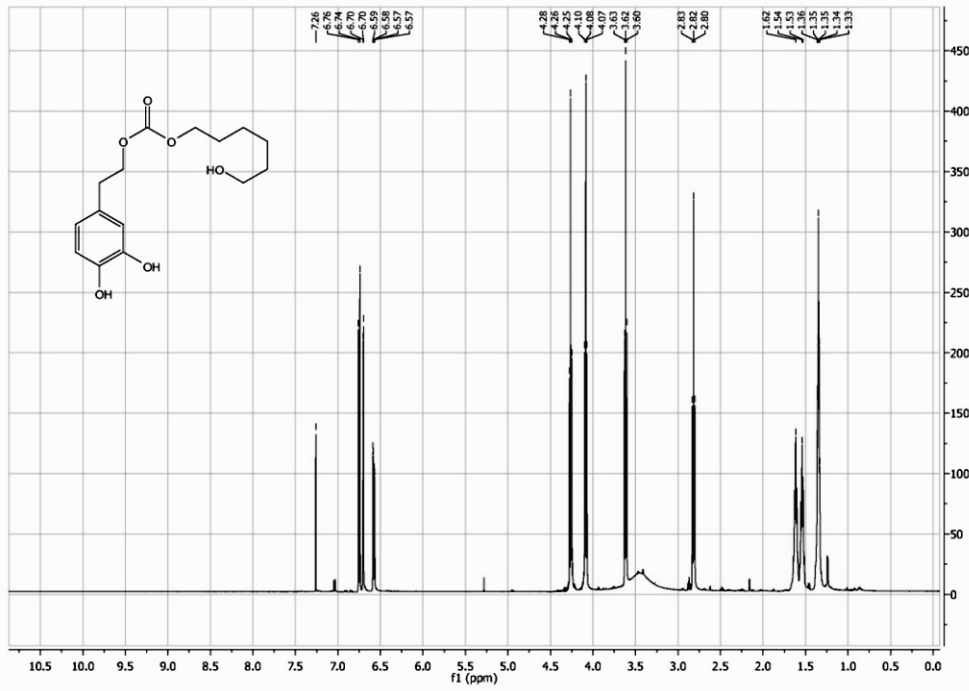


CAPÍTULO 7. ESPECTROS RMN

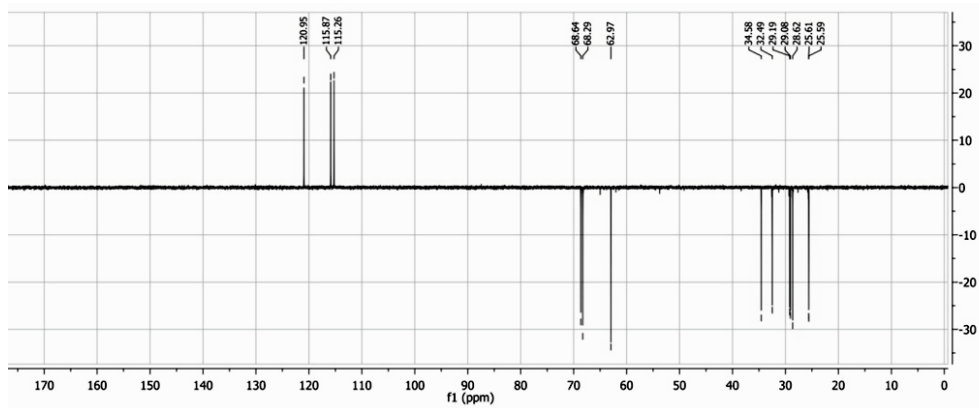
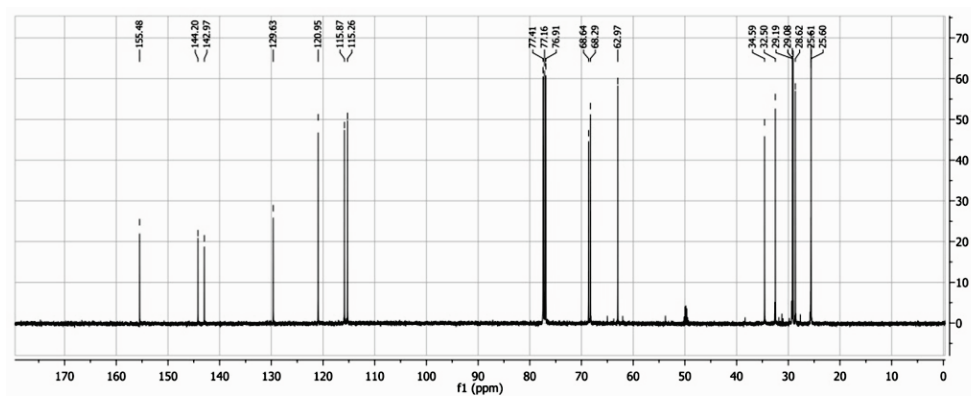
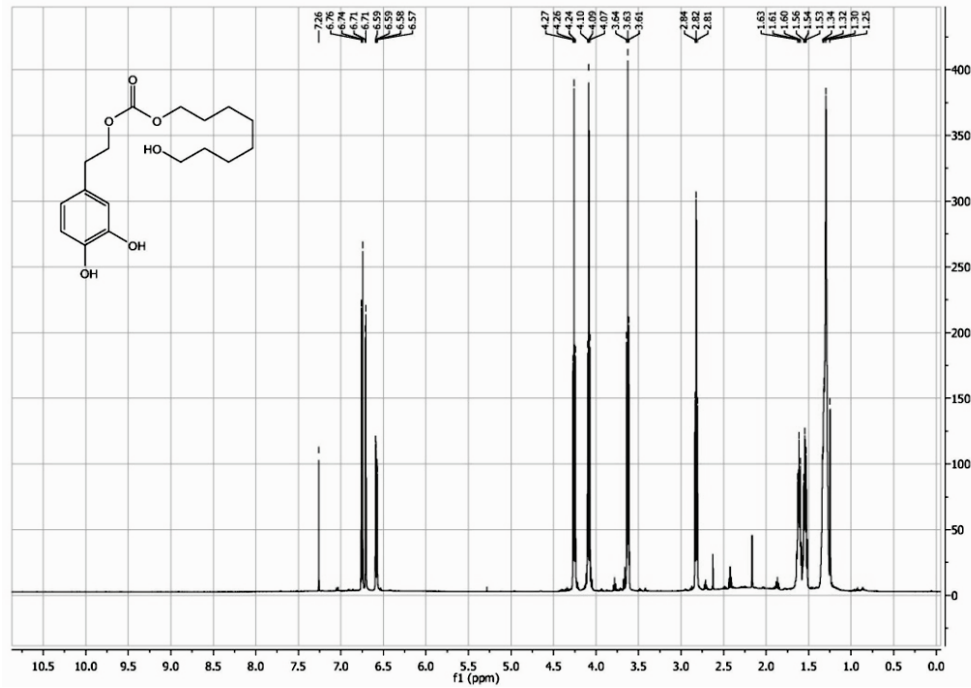
Producto 6b



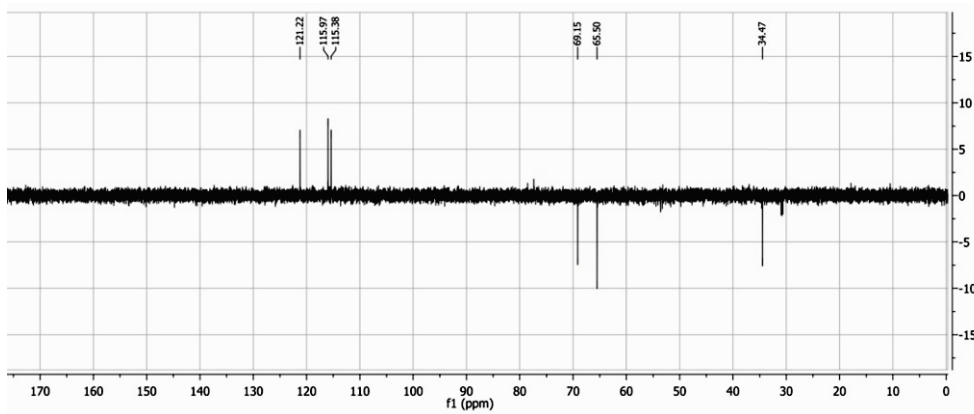
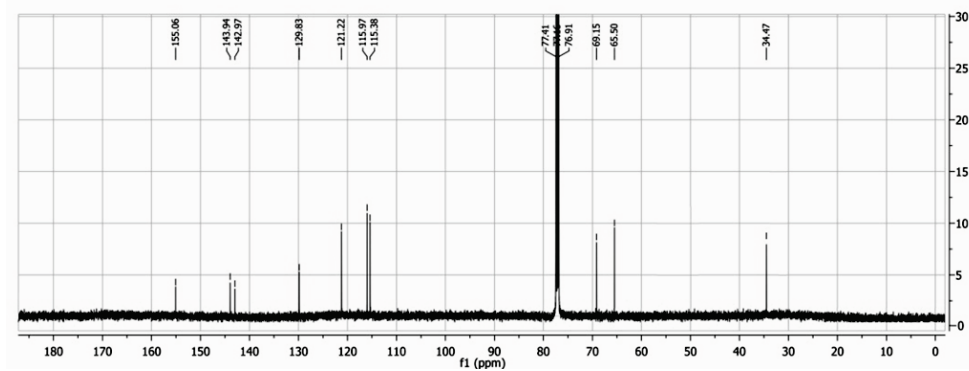
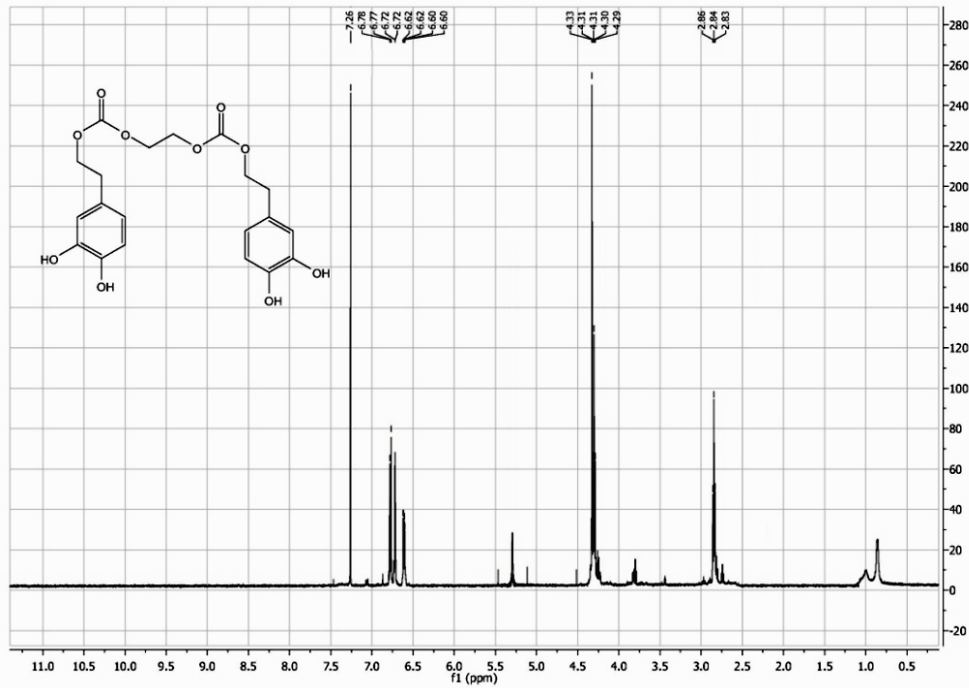
Producto 6c



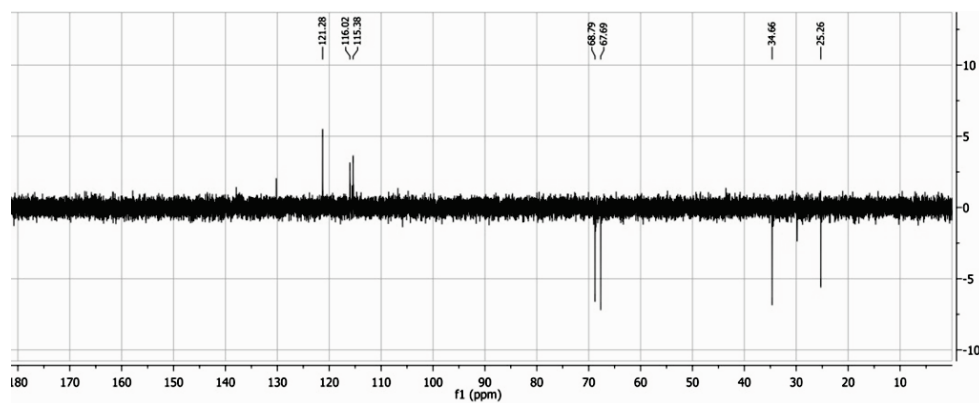
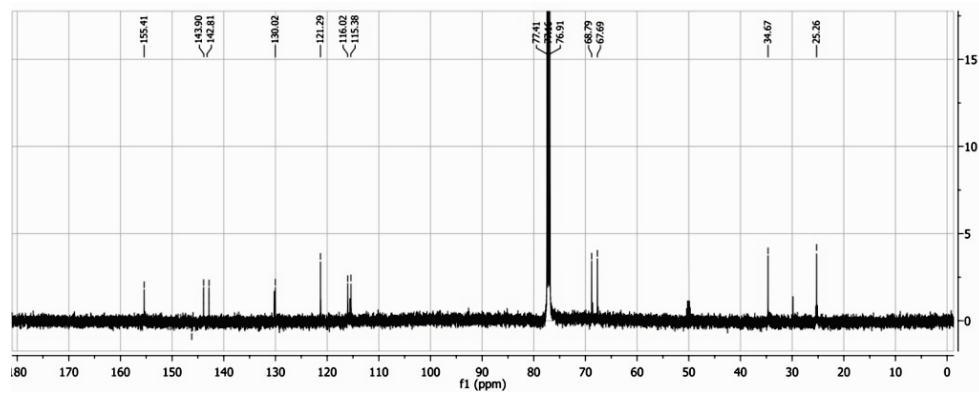
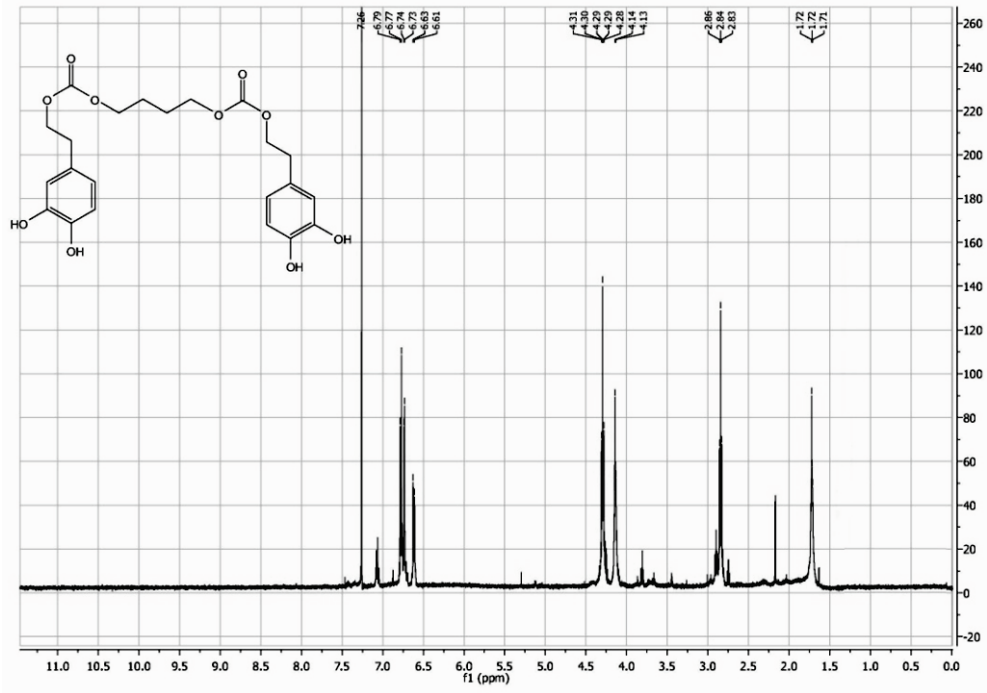
Producto 6d



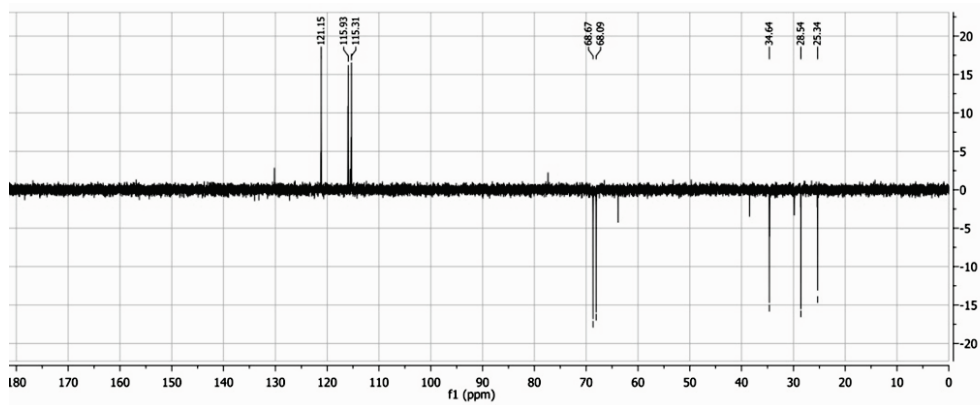
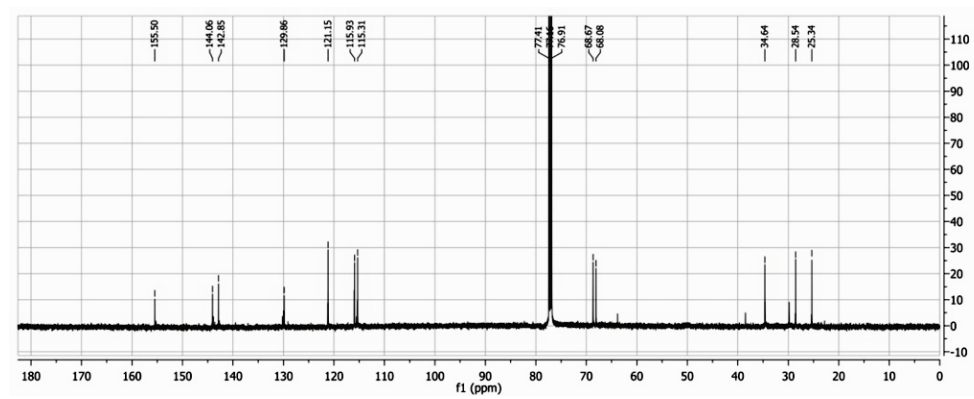
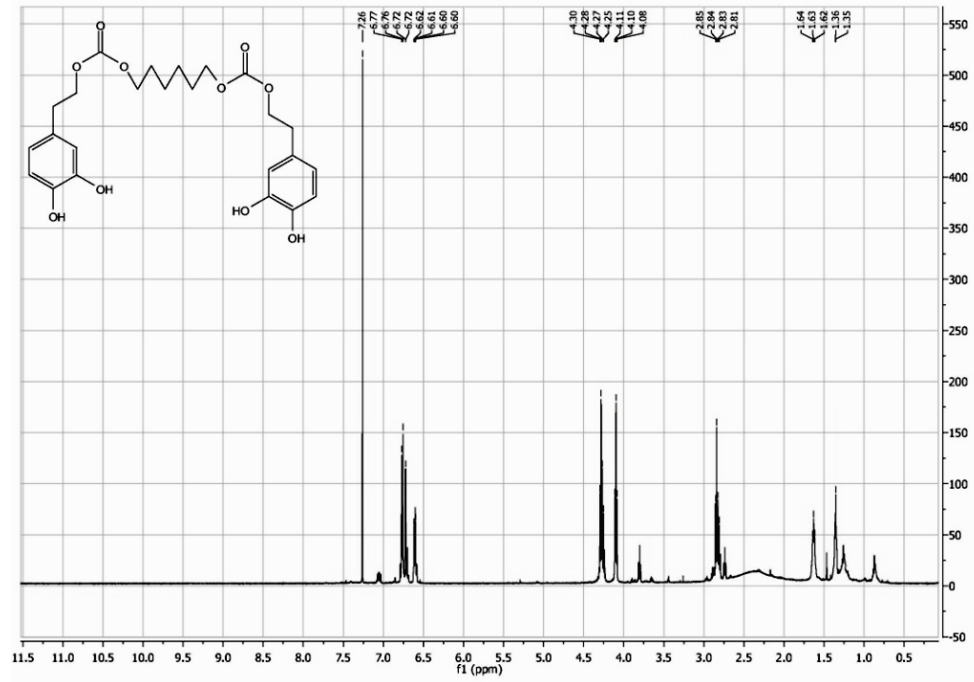
Producto 7a



Producto 7b



Producto 7c



Producto 7d

