

T 9/38

UNIVERSIDAD DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 23/02/2004
ENTRADA NUM. 144

SINTESIS QUÍMICA Y ENZIMÁTICA DE
NUEVOS ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS
DERIVADOS DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

MEMORIA
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR.

Antonio Juan Torres de Pinedo.

Enero 2004

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento: 615034148
N.º Copia: 16766729

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Departamento de Química Orgánica
GRADO DE DOCTORADO

Directores:

Fdo. Francisco Santoyo González.

(Catedrático de Química Orgánica)

Fdo. Juan Carlos Morales Sánchez.

(Investigador principal Área de Química,
Puleva Biotech S. A.)

UNIVERSIDAD DE GRANADA

SINTESIS QUÍMICA Y ENZIMÁTICA DE
NUEVOS ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS
DERIVADOS DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

MEMORIA
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR.

Antonio Juan Torres de Pinedo.

Enero 2004

Directores:

Fdo. Francisco Santoyo González.

(Catedrático de Química Orgánica)

Fdo. Juan Carlos Morales Sánchez.

(Investigador principal Área de Química,
Puleva Biotech S. A.)

ÍNDICE

Introducción	1
1.1 Radicales libres, oxidación y estrés oxidativo	2
1.1.1 Cadena de transporte electrónico.	3
1.1.2 Fotooxidación.	6
1.2 La oxidación sobre los sistemas biológicos.	8
1.2.1 Acción sobre pequeñas proteínas.	8
1.2.2 Acción sobre ácidos nucleicos y activación génica.	9
1.2.3 Acción sobre ácidos grasos; La peroxidación lipídica.	9
1.3 La oxidación en el deterioro de los alimentos.	11
1.3.1 Enranciamiento.	12
1.3.1.1 Enranciamiento oxidativo.	14
1.3.1.2 Enranciamiento por lipólisis.	14
1.3.1.3 Enranciamiento por cetónidos.	14
1.3.2 Mecanismo del enranciamiento oxidativo.	15
1.4 Antioxidantes.	18
1.4.1 Clasificación de los antioxidantes	19
1.4.2 Mecanismos antioxidantes.	21
1.4.2.1 Mecanismo radicalario de desactivación de radicales libres	21
1.4.2.1.1 Mecanismo aceptor de rotura de cadena	22
1.4.2.1.2 Mecanismo dador de ruptura de cadena.	23
1.4.2.1.3 Mecanismo complementario dador-aceptor.	24
1.4.2.2 Mecanismos no radicalarios de desactivación de radicales libres.	25
1.4.2.3 Sinergismo.	26
1.4.2.4 Desactivación de oxígeno singlete.	26
1.4.2.5 Agentes complejantes.	27
1.5 Antioxidantes empleados en alimentación.	28
1.5.1 Antioxidantes sintéticos.	28

1.5.1.1 Fenoles sintéticos.	28
1.5.1.2 Galatos	29
1.5.1.3 Derivados de ácido ascórbico	30
1.5.1.4 Compuestos heterocíclicos.	31
1.5.1.6 Otros.	31
1.5.2 Antioxidantes naturales.	32
1.5.2.1 Tocoferoles.	32
1.5.2.2 Lecitinas	34
1.5.2.3 Carotenoides	35
1.5.2.4 Ácido ascórbico	37
1.5.2.5 Compuestos fenólicos	37
1.5.3 Fuentes antioxidantes naturales empleadas en alimentación	41
1.5.3.1 Aceites vegetales comestibles.	41
1.5.3.2 Aceites de frutos y semillas.	41
1.5.3.3 Aceites de salvado de cereales y legumbres.	45
1.5.3.4 Antioxidantes provenientes de frutas y vegetales.	46
1.5.3.5 Antioxidantes provenientes de hierbas y especias.	47
1.6 Aplicación de los antioxidantes en alimentación.	49
1.6.1 Estabilización de grasas y aceites.	49
1.6.2 Empleo de antioxidantes en emulsiones grasas.	49
1.6.3 Empleo de antioxidantes en alimentos.	50
1.6.4 Niveles legales permitidos de antioxidantes.	50
2. Justificación y objetivos.	52
2.1 Elección de las moléculas a sintetizar.	53
2.2 Objetivos.	57

3. Antecedentes.	59
3.1 Biosíntesis de fenilpropanoides en plantas.	60
3.2 Reducción de ácidos carboxílicos; métodos de obtención de alcoholes.	63
3.2.1 Alcoholisis de haluros y anhídridos de ácido.	63
3.2.2 Reducciones con hidruros metálicos.	63
3.2.3 Reducciones con diborano	64
3.3 Métodos generales de formación de ésteres.	65
3.3.1 Alcoholisis de haluros y anhídridos de ácido.	65
3.3.2 Reactivos y técnicas especiales de acilación.	66
3.3.2.1 Catálisis de transferencia de fase.	66
3.3.2.2 Activación electrofílica.	67
3.4 Biocatálisis en síntesis química.	69
3.5 Determinación de la capacidad de captación de radicales libres mediante radicales cromogénicos	75
3.5.1 DPPH	76
3.5.2 ABTS	77
3.6 Determinación de la resistencia a la oxidación en los alimentos.	78
3.7 Métodos computacionales de cálculo empleados en química orgánica.	83
3.7.1 Antecedentes históricos.	83
3.7.2 Cálculo de propiedades moleculares a partir de funciones de onda aproximadas.	85
3.7.2.1 Geometría molecular.	85
3.7.2.2 Momentos dipolares.	86
3.7.2.3 Energías de ionización.	87
3.7.2.4 Energías de disociación.	87
3.7.2.5 Barreras rotacionales.	87

3.7.2.6 Energía relativa de isómeros.	88
3.7.3 Cálculo preciso de funciones de onda electrónicas y propiedades moleculares.	88
3.7.3.1 Bases.	88
3.7.3.2 Correlación electrónica.	89
3.7.3.3 La teoría funcional de densidad, (DFT).	90
3.7.4 Cálculos <i>ab initio</i> y semiempíricos.	90
4. Resultados y discusión.	94
4.1 Síntesis de alcoholes fenólicos derivados de fenilpropanoides.	95
4.1.1 Preparación del alcohol 3,4 dihidroxibencílico (alcohol protocateico).	96
4.1.2 Preparación de 2-(3,4 dihidroxifenil) etanol, (hidroxitirosol).	99
4.1.3 Preparación de 3-(3,4 dihidroxifenil) propanol, (Alcohol dihidrocafeílico).	102
4.1.4 Preparación de alcohol 3,4 dihidroxicinámico (Alcohol cafeílico).	103
4.1.5 Preparación de 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) propanol (Alcohol dihidroconiferílico).	107
4.1.6 Preparación del alcohol 4-hidroxi-3-metoxicinámico (alcohol coniferílico).	107
4.1.7 Preparación de 3-(3,4-dimetoxifenil) propanol.	109
4.1.8 Otros alcoholes sintetizados.	110
4.2 Propiedades antioxidantes de los nuevos compuestos.	114
4.2.1 Determinación de la capacidad de captación de radicales libres (RSA) mediante el método de DPPH.	115
4.2.2 Determinación de la actividad antioxidante en aceites vegetales mediante Rancimat.	118
4.2.3 Determinación de la actividad antioxidante en emulsión mediante el método del oxígeno activo (AOM).	119

4.2.4	Derminación de la polaridad de las moléculas mediante el logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua, log(P).	121
4.3	Síntesis de antioxidantes lipofílicos.	125
4.3.1	Síntesis química de antioxidantes lipofílicos.	125
4.3.2	Síntesis enzimática de antioxidantes lipofílicos.	131
4.3.2.1	Síntesis enzimática de ésteres butíricos.	138
4.3.2.2	Síntesis enzimática de ésteres palmíticos.	139
4.3.2.3	Síntesis enzimática de ésteres esteáricos.	140
4.3.2.4	Síntesis enzimática de ésteres oleicos.	140
4.3.2.5	Síntesis enzimática de ésteres poliinsaturados EPA y DHA.	141
4.3.2.6	Síntesis enzimática de ésteres palmíticos de 4-hidroxi, 3-metoxifenil alcoholes.	142
4.4	Capacidad antioxidante de los nuevos derivados lipofílicos.	144
4.4.1	Determinación de la capacidad de captación de radicales libres por el método del ABTS.	144
4.4.2	Determinación de la actividad antioxidante de los nuevos compuestos en aceites vegetales mediante rancimat.	146
4.4.3	Determinación de la actividad antioxidante en emulsión.	148
4.4.4	Derminación del logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua de los nuevos derivados.	148
4.5	Cálculos teóricos para la determinación de la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos.	150
4.5.1	Metodología	154
4.5.2	Resultados	155
5.	Parte experimental.	159
6.	Bibliografía.	190

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 RADICALES LIBRES, OXIDACIÓN Y EL ESTRÉS OXIDATIVO.

El oxígeno representa una paradoja para los organismos aeróbicos; resulta imprescindible pero al mismo tiempo es potencialmente tóxico.

El oxígeno fue descubierto en 1774 por el teólogo británico, J. Priestley, y bautizado como tal, poco tiempo después por el francés A. L. Lavoisier, pero no fue hasta principios del siglo pasado cuando empezara a profundizarse en el conocimiento que se tenía sobre este compuesto químico, y a descubrirse configuraciones electrónicas excitadas que conferían al elemento una gran reactividad (Mulliken, 1929).

Poco a poco, fueron apareciendo evidencias del potencial comportamiento tóxico de este compuesto y de las especies reactivas que de él derivan (Michaelis, 1949). Paul Bert, describe en su libro las manifestaciones tóxicas que presenta este compuesto, la sensibilidad de distintas especies, y la particular vulnerabilidad del sistema nervioso a este elemento (Bert, 1943).

Durante los años 60 se pusieron en marcha muchos estudios clínicos destinados a evaluar el efecto de la toxicidad del oxígeno en los organismos, y a dar explicación a lo que se conocía con el nombre de "el efecto oxígeno", que consistía en el aumento del daño celular producido por radiación ionizante en presencia de oxígeno, mientras que la ausencia del mismo suponía una protección (Bean, 1964), (Gray y Scott, 1964). La explicación a este fenómeno la dio Gerschman mediante una teoría donde atribuía el daño producido por el oxígeno, al aumento de la concentración intracelular de radicales libres (Gerschman, 1962).

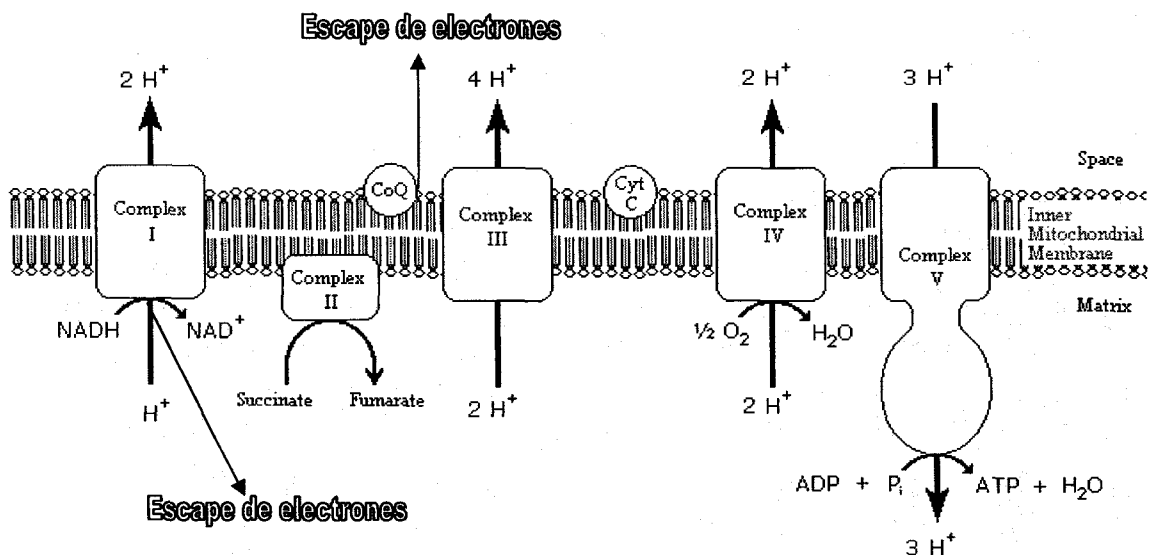
Los radicales libres se producen continuamente como consecuencia del metabolismo de las propias células y por la exposición a numerosos factores ambientales, entre los que destaca la radiación ultravioleta, a través del mecanismo conocido con el nombre de fotooxidación (Larson, R.A., 1988).

De esta forma, se pasó a considerar a los radicales libres como los principales responsables de numerosos procesos degenerativos relacionados con la edad, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las inmunodeficiencias (Harman, D. 1962; Harman, D. 1986).

1.1.1 Cadena de transporte electrónico.

Los seres vivos emplean el oxígeno atmosférico, para obtener la energía que necesitan para manejar su maquinaria biosintética, a partir de reacciones de oxidación sobre sustratos orgánicos. Aunque el oxígeno en su estado fundamental no es reactivo, el oxígeno se reduce, a través de una cadena sucesiva de reacciones durante los procesos metabólicos, hasta agua. Durante esta cadena de reacciones, se producen intermedios parcialmente reducidos, muy reactivos denominados radicales libres.

Las oxidaciones biológicas no ocurren mediante mecanismos sencillos de transferencia de electrones, sino que se producen a través de una serie de reacciones de oxidación-reducción acopladas, que implican distintos transportadores de electrones, como el NAD^+ o los citocromos, en donde el oxígeno es el último aceptor de electrones para los organismos aeróbicos, reduciéndose hasta agua. Al conjunto de reacciones de oxidación-reducción que dan lugar a la producción de energía química se conoce con el nombre de cadena de transporte electrónico o cadena respiratoria (figura 1), (Mathews-Van Holde; *Biochemistry*, 1996). Como subproductos de la utilización del oxígeno en las reacciones de oxidación, se producen una serie de subproductos altamente dañinos denominados especies reactivas de oxígeno o radicales libres.



-Figura 1-

En general, un radical libre contiene uno o más electrones desapareados en su última capa electrónica, que le confiere una gran reactividad. Los radicales libres son especies de vida media muy corta y su concentración en estado estacionario es baja (Prior, 1986). En la tabla 1 se recogen los principales radicales libres y especies reactivas de oxígeno y las moléculas sobre las que actúan predominantemente.

Al oxígeno en su forma normal se le conoce como oxígeno triplete. Sin embargo, existe una forma habitual de oxígeno tóxico, que se produce tanto fotoquímica como bioquímicamente, llamada oxígeno singlete. Otras formas tóxicas del oxígeno son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^\cdot), todos ellos producidos durante el proceso de reducción del oxígeno hasta agua durante la respiración (Halliwell y Gutteridge, 1999). Las flavoproteínas, quinonas, tioles y proteínas que contienen azufre también pueden llevar a cabo la reducción del H_2O hasta O_2^- . El superóxido es altamente reactivo y puede oxidar virtualmente cualquier compuesto orgánico dentro de la célula, incluyendo las macromoléculas (Halliwell y Gutteridge, 1999). Los peróxidos tales como el agua oxigenada (H_2O_2) se producen por acción de las superóxido dismutasas sobre los radicales superóxido. El peróxido de hidrógeno es un potente oxidante que atraviesa fácilmente las membranas biológicas a partir del cual pueden originarse radicales hidroxilo (Prior y Church, 1991). Los radicales hidroxilo constituyen la forma más tóxica del oxígeno, es una especie de las más reactivas que se conocen, y por tanto, presenta una vida media y un radio de acción muy cortos (microsegundos y angstroms, respectivamente). Un radical hidroxilo formado en una mitocondria será improbable que, por sí mismo, tenga un efecto directo en otras partes de la célula (Prior, 1986).

Siempre que un radical ceda un electrón a otra molécula, tome un electrón, o simplemente se una a alguna molécula no radicalaria, esta se transforma en otro radical, o especie reactiva de oxígeno, siendo una característica importante en este tipo de reacciones, el hecho de que normalmente se propagan en cadena. De esta forma, las reacciones en cadena, dan lugar a efectos biológicos lejos del sistema donde se originó el primer radical (Blake et al, 1987; Southorn et al, 1988). Sólo cuando dos

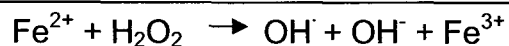
radicales se unen entre sí, desaparecen como tales radicales (Halliwell et al, 1992).

Radical	Nombre	Moléculas Diana
O_2^-	Superóxido	Enzimas
H_2O_2	Peróxido de Hidrógeno	Ác. Grasos insaturados
HO^\cdot	Hidroxilo	Todas
R^\cdot	Ariilo	Ác. Grasos insaturados
RO^\cdot	Oxilo	Ác. Grasos insaturados
ROO^\cdot	Peroxilo	Ác. Grasos insaturados
$ROOH$	Hidroperóxido	Ác. Grasos insaturados
1O_2	Oxígeno Singlete	Distintas moléculas
NO^\cdot	Nitroxilo	Distintas moléculas
CCl_3^\cdot	Triclorometileno	Oxígeno

-Tabla 1-

Cuantitativamente, la formación del radical superóxido a través de la cadena respiratoria es el sistema más importante de producción de radicales libres en las células (Sjodin et al, 1990). Existen otros mecanismos celulares que también implican producción de especies reactivas de oxígeno. Por ejemplo, la actuación de determinadas enzimas como la xantina oxidasa (Littarru et al, 1994) o la lipooxigenasa (Galliard et al, 1980) y la presencia de metales de transición (Halliwell y Gutteridge, 1985), pueden inducir la formación de radicales, estando estos procesos generalmente relacionados con desórdenes fisiológicos (Halliwell y Gutteridge, 1999).

El hierro y el cobre son los cationes metálicos más importantes en los procesos de producción de especies reactivas de oxígeno mediados por metales. Los organismos tienden a evitar la disponibilidad de estos metales ya sea uniéndolos a proteínas de transporte o de almacenamiento. La importancia del hierro radica en que es capaz de catalizar la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno generando radical hidroxilo, proceso conocido como reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1985).



1.1.2 Fotooxidación.

Al igual que el oxígeno, la luz es esencial para las plantas, ya que a través de los pigmentos, absorben la energía lumínica, y la emplean en la fijación del carbono. Pero la luz solar contiene un pequeño porcentaje, en torno al 4%, de radiación con longitudes de onda por debajo de 400 nm (UV), que afecta enormemente a los procesos metabólicos de las plantas. Se ha comprobado, que aumentos en la intensidad de luz ultravioleta afectan a la fotosíntesis, la respiración, asimilación de la glucosa y la fosforilación (Kandler et al, 1959). Los efectos fisiológicos de la radiación incluyen disminución de estomas, variaciones en la concentración de clorofilas, proteínas y lípidos, reducción del área de la hoja y daño tisular (Teramura et al, 1983).

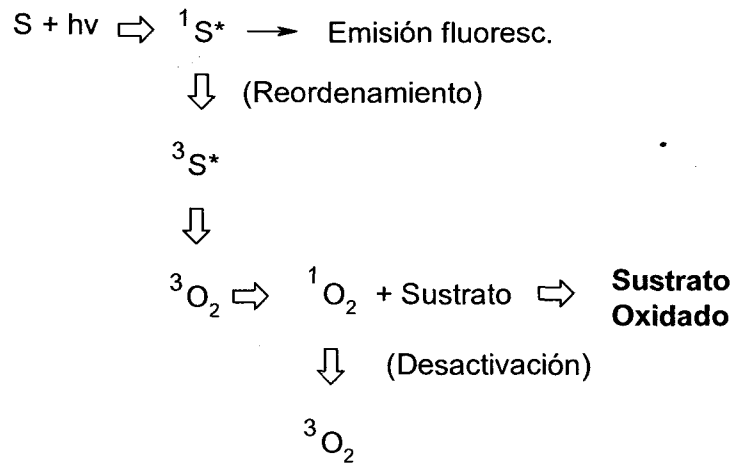
El daño fotoquímico que se produce en las células comienza con la absorción por parte de algún cromóforo (S) de un fotón que eleva su energía electrónica desde el estado fundamental a un estado excitado singlete de configuración electrónica inestable, figura 2 (Larson, 1988). La molécula excitada puede evolucionar de distinto modo; puede desactivarse mediante emisión fluorescente, o bien, reaccionar con alguna molécula cercana, aunque su periodo de vida muy corto, hace que su radio de acción sea limitado. O bien puede sufrir reordenamientos electrónicos internos a estados excitados triplete de mayor vida media.

La ruta principal de formación de especies dañinas derivadas de los estados triplete, es la transferencia de su energía de excitación a la molécula de oxígeno. El producto de esta transferencia energética es la formación de oxígeno singlete $^1\text{O}_2$. Numerosas moléculas biológicas son susceptibles de ser atacadas por el oxígeno singlete, entre ellas, los aminoácidos proteicos (cisteína, metionina, triptófano e histidina) y los lípidos poliinsaturados.

El oxígeno singlete es por tanto muy reactivo y resulta sumamente importante desactivarlo, devolviéndolo rápidamente a su estado original triplete.

Como veremos más adelante el ataque sobre los lípidos poliinsaturados origina hidroperóxidos lipídicos que contribuyen a aumentar el daño producido

sobre las membranas de los orgánulos y al aumento de las disfunciones celulares (Larson, 1988).



-Figura 2-

Las células han desarrollado mecanismos de defensa para contrarrestar el efecto lesivo de estos radicales pero, en casos de intoxicación masiva o continuada, los sistemas celulares pueden verse superados, lo que condiciona una situación conocida con el nombre de **estrés oxidativo**. El estrés oxidativo conduce a una serie de lesiones a nivel bioquímico y fisiológico que generalmente origina desajustes metabólicos y muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 1999).

1.2 LA OXIDACIÓN SOBRE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS.

Las especies reactivas de oxígeno pueden reaccionar con macromoléculas como el ADN, proteínas y lípidos, causando mutaciones, destrucción proteica, bloqueo enzimático y peroxidación de las membranas lipídicas. Todos estos daños están relacionados con numerosas enfermedades y procesos degenerativos, como la edad, el cáncer o inmunodeficiencias en animales, así como en el desarrollo y fisiología de las plantas, donde además, bloquean los sistemas antioxidantes naturales, producen la destrucción de clorofilas y disminuyen los procesos fotosintéticos (Vichnevetskaia et al 1999).

1.2.1 Acción sobre Proteínas.

Una de las consecuencias biológicas más graves de la acción de los radicales libres y de las especies reactivas de oxígeno es la oxidación de enzimas y de proteínas, que conlleva la pérdida de funcionalidad de las mismas y alteraciones graves en la arquitectura celular (Lunec, 1992).

La posibilidad de que una proteína sea atacada por una especie reactiva de oxígeno depende de su composición en aminoácidos y de la accesibilidad de los mismos; no todos los aminoácidos son igualmente susceptibles a la oxidación, los aminoácidos más reactivos frente a los radicales libres son, como se ha comentado anteriormente la histidina, metionina, cisteína, triptófano y tirosina (Gebiki et al, 1993).

El inicio de la reacción radicalaria en cadena se va normalmente favorecido por la presencia de iones de metales de transición (hierro y cobre principalmente), que se complejan en el ambiente proteico provocando oxidaciones localizadas que pueden afectar a los aminoácidos más sensibles (Freeman et al, 1982). Las especies reactivas de oxígeno pueden provocar el entrecruzamiento de las cadenas proteicas por formación de puentes disulfuro, así como fragmentaciones en las proteínas (Wolf et al, 1986). En conjunto, el ataque a proteínas celulares incluye cambios conformacionales, pérdida de actividad enzimática, aumento de la susceptibilidad a proteasas y alteraciones de la inmunogenicidad (Mugli, 1993).

1.2.2 Acción sobre ácidos nucleicos y activación génica.

El ataque de los radicales libres (sobre todo del radical hidroxilo) sobre las moléculas de ácidos nucleicos producen modificaciones en las bases (tanto púricas como pirimidínicas). Los efectos pueden ir desde hidroxilaciones de bases a roturas simples o dobles de la hélice. Se pueden producir agresiones más drásticas, como adición de grupos químicos, apertura de anillos, deleción de bases, etc (Halliwell y Aruoma, 1993).

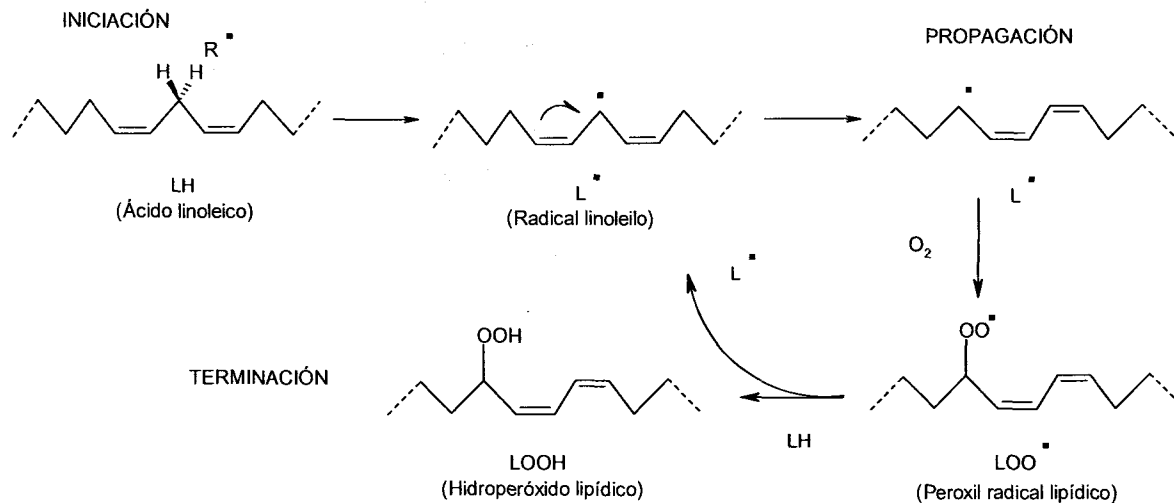
Los radicales libres son capaces de activar la transcripción genética induciendo rápidamente genes que codifican factores de transcripción, que participan en la modulación del crecimiento celular, en la diferenciación, en el desarrollo e incluso pueden programar la muerte celular por apoptosis (Halliwell y Gutteridge, 1999).

1.2.3 Acción sobre ácidos grasos; La peroxidación lipídica.

La reacción de oxidación de los ácidos grasos fue uno de los primeros aspectos de la química de los radicales libres en ser estudiados a fondo. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) se encuentran en la célula en forma libre, formando tioésteres (Acil CoA) o como ésteres (fosfolípidos, ésteres de colesterol, triglicéridos...). La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados se conoce con el nombre de peroxidación lipídica o autooxidación, siendo especialmente importante cuando ocurre a nivel de los fosfolípidos de las membranas o de las lipoproteínas, siendo este fenómeno oxidativo la forma más conocida de la toxicidad del oxígeno (Halliwell y Chirico, 1993).

La duración y la velocidad de la reacción en cadena de peroxidación depende directamente del grado de insaturación lipídica; la velocidad de peroxidación del ácido oleico (monoinsaturado) es unas 300 veces menor que la del ácido DHA (poliinsaturado con 6 dobles enlaces).

En la figura 3 se muestra esquemáticamente el proceso de peroxidación lipídica sobre un ácido graso poliinsaturado como el ácido linoleico.



-Figura 3-

En la etapa de iniciación, un radical libre con suficiente energía puede abstraer fácilmente un átomo de hidrógeno de los carbonos metilénicos alílicos de los ácidos poliinsaturados (LH), iniciando la reacción en cadena sobre la masa lipídica; el radical centrado sobre el carbono (L^\bullet) provoca una reordenación de los dobles enlaces en forma de dienos conjugados, que rápidamente reaccionan con oxígeno molecular formando un peroxil radical lipídico (LOO^\bullet) que puede a su vez abstraer otro átomo de hidrógeno estabilizándose en forma de hidropéroxido lipídico ($LOOH$), dejando el radical sobre el metileno de otro ácido graso. La peroxidación lipídica puede ser amplificada hasta que se agote la disponibilidad de oxígeno y de cadenas poliinsaturadas no oxidadas.

La etapa de terminación es una interacción bimolecular entre dos peroxil radicales lipídicos para dar un producto no radicalario, que conlleva el cese de la reacción en cadena.

1.3 LA OXIDACIÓN EN EL DETERIORO DE LOS ALIMENTOS.

Los alimentos son perecederos por naturaleza. Durante el proceso de elaboración, almacenamiento y distribución de los alimentos, están expuestos a una gran variedad de condiciones ambientales: presión, temperatura, humedad, oxígeno, luz, microorganismos, etc, que pueden disparar mecanismos de reacción oxidativos que conducen a la pérdida de sus características sensoriales, y en ciertos casos, pueden suponer un riesgo para la salud (Singh, 1994).

Las principales causas que pueden modificar la calidad de los alimentos durante su vida útil son el contacto con microorganismos y las modificaciones químicas debidas al procesado y/o almacenamiento (Borgstrom, 1968).

Las fuentes de organismos que pueden afectar a la calidad de los alimentos son muy numerosas, van desde hongos y bacterias hasta insectos y roedores. Los microorganismos tienen cada uno sus propias condiciones optimas de desarrollo. Dependiendo del procedimiento de elaboración y almacenaje, van a poder desarrollarse unos microorganismos u otros. Las frutas y verduras tienen sus propios mecanismos de defensa contra microorganismos y agentes infecciosos mientras se cultivan, pero después de la recolección sufren rápidamente proliferación de microorganismos. Igual ocurre con la carne y el pescado (Borgstrom, 1968).

Los cambios químicos que se producen en los alimentos como consecuencia de su elaboración y almacenamiento también originan pérdidas en su calidad sensorial y nutricional. Estos cambios pueden estar mediados por la acción de enzimas, o bien factores ambientales como luz, humedad, oxígeno, etc. La maduración de las frutas es un ejemplo de cómo se producen modificaciones químicas por la acción de enzimas. En cambio, las reacciones de autooxidación que se producen en los aceites de pescado como consecuencia de la luz y el oxígeno atmosférico, constituye un ejemplo de modificaciones químicas debido a factores ambientales (Pokorný, 1990).

La conservación de los alimentos involucra a todas aquellas acciones que se toman para mantener la calidad y propiedades óptimas del alimento durante el mayor tiempo posible (Rahman, 1999).

Existe un gran número de técnicas y métodos destinados a la conservación de los alimentos, la aplicación de uno u otro depende básicamente de la propiedad que se pretenda preservar. Podemos indicar algunos métodos, tanto físicos como químicos, que se emplean convencionalmente en la conservación de los alimentos. Por ejemplo, la esterilización que provoca la muerte de los microorganismos, modificaciones de pH, para evitar su proliferación, secado y liofilizado, para mantener la humedad lo más baja posible, frío, que controla la cinética de acción de las enzimas, inactivación enzimática por calor o degradación proteica, **adición de antioxidantes**, o envasado apropiado, sin oxígeno, con materiales no permeables.

Hoy en día se emplean además técnicas modernas que utilizan pulsos de campos eléctricos, tratamientos a altas presiones o ultrasonidos, que pretenden asegurar una mayor calidad y seguridad de los productos. Por otro lado, se ha avanzado de forma paralela en técnicas indirectas que repercuten sobre la calidad final del producto, como pueden ser las técnicas de envasado y de control de los puntos críticos del proceso (Rahman, 1999).

De todos los componentes que forman un alimento, la oxidación de las grasas es el proceso oxidativo que más repercute tanto en el deterioro químico como sensorial del mismo (Warner, 1995).

1.3.1 Enranciamiento.

El enranciamiento es uno de los defectos más indeseables en la calidad de un alimento. Se dice que una grasa, un aceite o un alimento graso en general está rancio cuando se perciben un deterioro significativo en las características organolépticas del producto, particularmente en el aroma y el sabor, aunque en algunos casos se ve afectada también la textura, como en el caso del pescado (Warner, 1995). El enranciamiento supone numerosos cambios, pero fundamentalmente se afectan los componentes lipídicos.

La percepción sensorial del enranciamiento se debe a la presencia de numerosas moléculas de entre 3 y 12 átomos de carbono cuya naturaleza química es muy variada, entre las que se encuentran aldehidos, cetonas, alcoholes y esteres volátiles (tabla 2) (Przybylski, 1995).

alcohols

ethanol
 2-methyl-3-buten-2-ol
 2-methyl-1-propanol
 1-penten-3-ol
 3-methyl-1-butanol
 2-methyl-1-butanol
trans-2-penten-1-ol
 3-methyl-2-buten-1-ol
cis-2-penten-1-ol
 4-ethylphenol
 1-methyl-4-(1-methylethyl)-3-c
 1-cyclohexyl-2-buten-1-ol
 1-octen-3-ol
 1,*cis*-5-octadien-3-ol
 2-butyl-1-octanol
 4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-c

aldehydes

ethanal
 2-methylpropanal
 butanal
 3-methylbutanal
trans-2-butenal
 pentanal
 2-methyl-2-butenal
cis-2-pentenal
trans-2-pentenal
 hexanal
cis-3-hexenal
 4-methyl-3-pentenal
 2-methylpentadlenal
trans-2-hexenal
 2-furaldehyde
 5-methylhexanal
 heptanal
cis-4-heptenal
cis-2-heptenal
trans,trans-2,4-hexadienal
trans-2-heptenal
 benzaldehyde
 octanal
trans,cis-2,4-heptadienal
trans,trans-2,4-heptadienal
cis-2-octenal
trans-2-octenal
 benzeneacet. aldehyde
 nonanal
trans,cis-2,4-octadienal
trans,trans-2,4-octadienal
trans-2-nonenal
trans,cis-2,6-nonadienal
 decanal
trans,cis-2,4-nonadienal[§]
trans,trans-2,4-nonadienal
trans-2-decanal
 undecanal
trans,cis-2,4-decadienal[§]
trans,trans-2,4-decadienal
trans-2-undecenal

furans

2-methylfuran
 2-ethylfuran
 3-methylfuran
 2,3-dihydro-4-methylfuran
 2-(2-propenyl)furan
 2-butylfuran
 2-pentylfuran

noncyclic hydrocarbons

2-pentene
 hexane
 1,*trans*-4-hexadiene

noncyclic hydrocarbons (continued)

1,*cis*-4-hexadiene
 heptane
 octane
 1,6-octadiene
trans-4-octene
trans-2-octene
trans,trans-2,4-octadiene
 3-methyl-1,*trans*-4-heptadiene
 1,*trans,trans*-3,6-octatriene
 1,*trans,trans*-3,5-octatriene
 4-ethyl-3-octene
 3,3-diethylpentane
 5-methyl-*trans*-4-undecene
 5-methyl-4-nonene
 2,2-dimethyldecane
 5-methyl-4-nonene
 2-decyne
 1-decyne
 2,6-dimethyl-3-octene
 1,9-decadiene
 3-methyl-2-nonene
trans,trans-2,8-decadiene
trans,cis-2,8-decadiene
 4,5-dimethyl-2,6-octadiene
trans-3-undecen-5-yne
 6-dodecene
cis-3-undecen-5-yne
 4-methyl-1-undecene
 7-methyl-1-undecene
 5-methyl-1-undecene
 5-methyl-5-undecene
 7-methyl-5-undecene
 5-methyl-4-undecene
 6-dodecene
 3-methyl-2-undecene
 3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene
trans-7-tetradecene

cyclic hydrocarbons

benzene
 toluene
 5,5-dimethyl-1,3-cyclopentadiene
 ethylbenzene
p-xylene
 1-ethenyl-3-methylenecyclopentene
 styrene
 1,2-dimethyl-1,4-cyclohexadiene
 1,3,5-trimethylbenzene
c-limonene
 1-ethyl-3-methylcyclopentane
 3-ethenylcyclooctene
 2,4-diethenyl-1-methylcyclohexane
 3-(2-propenyl)cyclooctene
 1-methylcyclooctene

ketones

2,3-butanedione[§]
 1-penten-3-one
trans-3-penten-2-one
 2-hexanone
 1-hexen-3-one
 1-methoxy-3-methylene-2-pentanone
 3-hydroxy-2-pentanone
 3-heptanone
 2-heptanone
 1-methoxy-3-methylene-2-pentanone
 cyclohexanone
 1-octen-3-one
 2,3-octanedione
 6-methyl-5-hepten-2-one
 1,*cis*-5-octadien-3-one
trans-3-octen-2-one
 1-nonen-3-one

ketones (continued)

2-nonanone
trans,cis-3,5-octadien-2-one
trans,trans-3,5-octadien-2-one
 2-undecanone

miscellaneous

chloroform
 dimethyl disulfide
 2-methylthiophene
 ethyl acetate[§]
 propyl acetate
 butyl acetate
 pentyl acetate
 3-methyl-1-butanol acetate
 2-methyl-2-butanol acetate
 acetic acid[§]
 1-chloropentane
 1,2-dichloropentane
 1-chloroheptane
 unknown[§]
 unknown[§]

En los alimentos con alto contenido graso se producen varios tipos de enranciamientos no siempre relacionados con procesos oxidativos (Pokorný, 1990).

1.3.1.1 Enranciamiento oxidativo.

Es el principal tipo de enranciamiento que sufren los alimentos, también denominado autooxidación. Constituye un ejemplo más de peroxidación lipídica promovida por radicales libres. Durante la autooxidación, los ácidos grasos insaturados son lentamente oxidados en la matriz del alimento. Los ácidos poliinsaturados son más sensibles a procesos oxidativos, siendo alterados incluso por el oxígeno del aire. Mientras que los correspondientes derivados saturados son los más estables, aunque también pueden oxidarse a elevadas temperaturas (Porter et al, 1995; Chan, 1987).

1.3.1.2 Enranciamiento por lipólisis.

Se debe a la hidrólisis que sufren los triglicéridos por acción de lipasas dando lugar a diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres. La presencia de ácidos grasos libres, no cambia las propiedades nutricionales del alimento, ya que en el estómago también se someten a la acción de lipasas para poderlos asimilar, pero si se modifica su palatabilidad. En los alimentos que contienen grasa láctea, pueden hidrolizarse por lipólisis ésteres de ácido butírico que confieren un desagradable olor que recuerda a mantequilla rancia. Otras grasas y aceites, como los aceites de coco y palma, con ésteres de ácidos de entre 6 y 10 carbonos, les ocurre algo similar; suelen desprender olores desagradables durante periodos de almacenamiento largos (Scanlon et al, 1965).

1.3.1.3 Enranciamiento por cetónidos.

Se origina por la degradación microbiana que sufren los ácidos grasos de cadena media, que son transformados en metilcetonas, confiriendo a los alimentos olores florales o a queso azul (Kellard, 1985).

1.3.2 Mecanismo del enranciamiento oxidativo.

El inicio de la reacción radicalaria en cadena se ve normalmente favorecido por la presencia de iones metálicos de transición principalmente hierro y cobre. Estos metales son capaces de acelerar la reacción de descomposición del hidroperóxido lipídico en radicales libres (Pokorný, 1987).

Varias enzimas son capaces también de iniciar la oxidación lipídica, principalmente lipoxigenasas, que catalizan la oxidación del ácido linoleico, y otros ácidos grasos relacionados. Las lipoxigenasas suelen ir acompañadas de sus respectivas liasas, que rompen los hidroperóxidos en distintos compuestos de bajo peso molecular (Gardner, 1996).

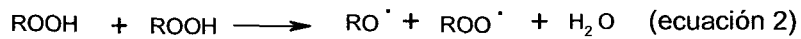
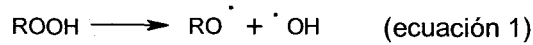
Los hidroperóxidos lipídicos formados, además de originar radicales libres, pueden romperse por los dobles enlaces contiguos, formando compuestos volátiles de bajo peso molecular. Los productos resultantes de la ruptura de los hidroperóxidos pueden ser etano, eteno, pentano, aldehidos, cetonas, ésteres, lactonas, alcoholes o éteres, saturados o insaturados. Entre los aldehidos se pueden encontrar alcanales, alquenes, alcadienes, alcatriones, que pueden originar olores agradables o desagradables (tabla 2). Estos compuestos, considerados como productos secundarios de reacción, son susceptibles de volver a oxidarse incrementando el proceso oxidativo (Grosch, 1987).

La concentración de muchos de estos compuestos, suficiente para generar una apreciación organoléptica, están en el rango de las ppm e incluso las ppb. Por ello, cantidades muy pequeñas de productos de degradación, pueden tener un efecto significativo sobre el olor de una grasa o de una matriz que la contenga.

La formación de muchos de estos compuestos se explica a partir de la estructura original de los hidroperóxidos, por las rutas principales de ruptura de la molécula. Hay algunos que no se pueden explicar, bien sea por la presencia de sustratos no previstos como pueden ser trazas de ácidos no identificados con dobles enlaces en posiciones no habituales, bien sea por rutas de oxidación inusuales.

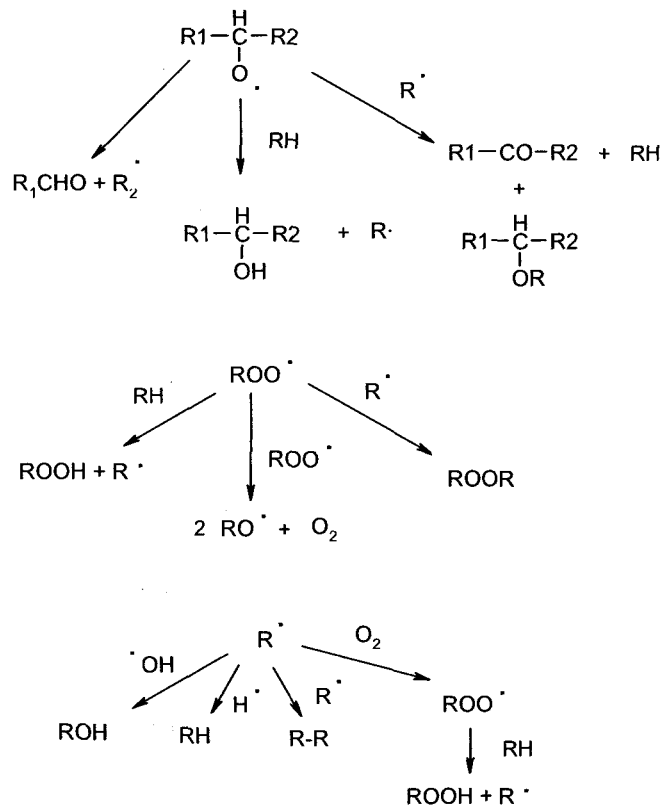
Cuando la concentración de hidroperóxidos es baja, su descomposición se realiza a nivel monomolecular (ecuación 1, figura 4), esta vía es la más usual en muchos productos alimentarios. A medida que la oxidación progresa y

aumenta la velocidad de formación de hidroperóxidos, se alcanzan concentraciones suficientes para que el mecanismo pase a ser bimolecular (ecuación 2, figura 4).



-Figura 4-

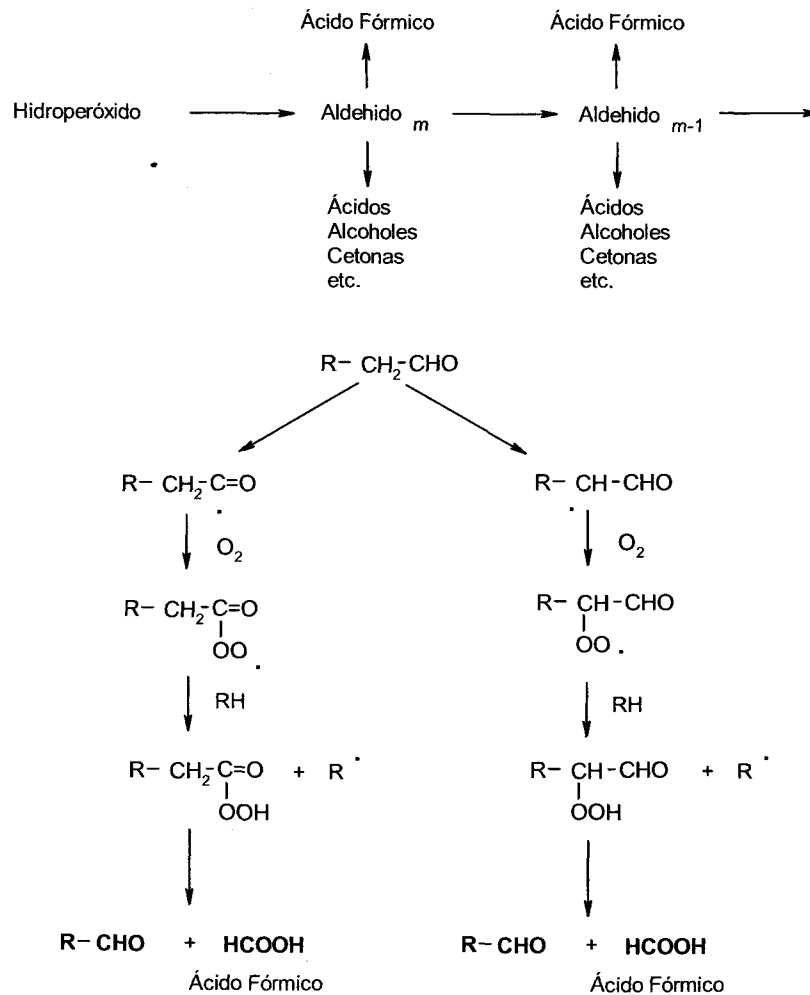
En el proceso de oxidación de lípidos se originan tres tipos de radicales libres: alcóxidos, peróxidos y alquilo. Su evolución es muy importante en el desarrollo del enranciamiento. En la figura 5 se representan posibles vías de descomposición de estos radicales que generan aldehidos, cetonas, alcoholes, ácidos etc., que en posteriores oxidaciones, se transforman en los productos identificados en un sistema lipídico oxidado.



-Figura 5-

En la figura 6 se muestra una vía de degradación de aldehidos saturados para dar paso a cadenas cada vez más cortas. Los aldehidos insaturados

forman un mayor número de hidroperóxidos y su evolución es todavía más compleja.



-Figura 6-

Al comienzo de la reacción de oxidación, la concentración de radicales libres es baja y la oxidación muy lenta. Gradualmente, la concentración de hidroperóxidos y de otros productos de oxidación generados, disparan la concentración de radicales libres y por tanto la velocidad de la reacción de oxidación. La etapa durante la cual la oxidación transcurre de forma lenta se denomina periodo de inducción. El almacenamiento de los productos grasos susceptibles de sufrir oxidación se limita al periodo de inducción. La adición de antioxidantes no consigue eliminar por completo la reacción de oxidación, pero si aumentan considerablemente el periodo de inducción y por tanto los tiempos de almacenamiento de los productos (Pokorný, 1999).

1.4 ANTIOXIDANTES.

Por definición, un antioxidante es cualquier sustancia que, presente en menor concentración que un sustrato oxidable (ácidos grasos poliinsaturados, proteínas etc.), retrasa o previene la oxidación del mismo. Se consideran antioxidantes a aquellos compuestos de naturaleza ácida con capacidad para donar electrones o átomos de hidrógeno a alcoxil y peroxil radicales, complejar metales prooxidantes de transición, o incluso regenerar otros antioxidantes (Pospísil, 1989; Auroma, 2003).

Los mecanismos antioxidantes de los sistemas biológicos consisten en enzimas y compuestos de bajo peso molecular (entre ellos péptidos, vitaminas, flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides, etc.), integrados dentro de cadenas eficaces de disintoxicación.

Los principales avances científicos en el campo se han conseguido gracias a las investigaciones realizadas en medicina y la bioquímica clínica y al interés de la industria alimentaria en el empleo de estas sustancias para preservar los alimentos, ya que la formación de los lipoperóxidos está estrechamente relacionada con el enranciamiento, como se ha comentado en el capítulo anterior

Los primeros estudios científicos en compuestos antioxidantes datan de los años 20, cuando los químicos franceses Moreau y Dufraise (1924) relatan la existencia de distintos compuestos capaces de detener las reacciones de oxidación. En estos años también, Evan y Bishop llegaron a la conclusión de que el cambio físico observado en el aspecto de las grasas vegetales al contacto con el oxígeno, se veía reducido con el empleo de un eficaz antioxidante llamado vitamina E o tocoferol (Evan et al, 1922).

En los años 60, se conocía el efecto perjudicial que tenía la aplicación de anestésicos en los pacientes, atribuido a la formación de peróxidos nocivos (Di Luzio, 1967), y como el empleo de antioxidantes sintéticos (BHT, propil galatos...) o naturales (tocoferol) reducían los efectos perjudiciales de estos tratamientos (Gallagher, 1961). Similares mecanismos se emplearon para explicar el daño producido en el hígado de los alcohólicos y del efecto protector que tenía el empleo de antioxidantes (Reitz, 1975). Posteriores investigaciones pusieron de manifiesto que, el efecto protector frente a los radicales libres que

tenía la vitamina E sobre la fase lipídica de las células, se complementaba, en la fase acuosa de las células, principalmente por tres antioxidantes hidrosolubles: la vitamina C, el ácido úrico y el glutatión (Miquel, 1989).

Poco a poco fueron surgiendo distintos hitos científicos, que suponían importantes avances en la explicación y el conocimiento que se tenía sobre los mecanismos de desintoxicación de los organismos. Como por ejemplo, el trabajo de De Duve, donde explicaba la presencia abundante de catalasa en ciertos microorgánulos (peroxisomas) encontrados en las células hepáticas, y que estaban involucrados en la eliminación de peróxidos nocivos (De Duve, 1969). Otro hecho importante, fue la identificación que realizaron McCord y Fridovich de las enzimas superóxido dismutasas (SOD) (McCord y Fridovich, 1968). Estas enzimas eliminan eficazmente radicales superóxido y previenen del daño oxidativo y se comprobó su eficacia en la prevención del cáncer en el personal afectado por la radiación en el accidente de Chernobil (Emerit et al, 1995). Un mecanismo más de defensa antioxidante lo constituye la enzima glutatión peroxidasa, que en presencia de selenio, elimina el peróxido de hidrógeno, utilizándolo para oxidar la molécula de glutatión (Flohe, 1973).

En un contexto biomédico, es importante destacar que la exposición de animales de experimentación a atmósferas ricas en oxígeno, provoca un aumento en los niveles de SOD, catalasa y glutatión peroxidasa. Sin la adecuada protección antioxidante, un aumento súbito de radicales libres, puede hacer que los mecanismos antioxidantes sean insuficientes, lo que origina daño oxidativo. Estos aumentos súbitos en la concentración de radicales y fallos en los mecanismos de desintoxicación celular, son similares a los que ocurren en las enfermedades degenerativas o con la edad. Lo que sugiere que una ingesta adecuada en antioxidantes puede proporcionar protección frente a estas enfermedades incluso mayor longevidad (Harman, 1978) (Miquel 1989).

1.4.1 Clasificación de los antioxidantes.

Una primera clasificación de los antioxidantes se puede hacer dependiendo del medio donde actúen, en lipofílicos, como la vitamina E, e hidrofílicos por ejemplo la vitamina C.

Un segundo criterio que normalmente se emplea, es clasificar a los antioxidantes en función de su origen y ruta de penetración en el organismo; de

esta forma nos encontramos con antioxidantes endógenos, cuando el propio organismo es el que lo sintetiza y lo transporta a través de los distintos humores hasta el lugar de actuación, y antioxidantes exógenos, cuando el organismo no puede sintetizarlo y lo toma de fuera, por ejemplo en la dieta (Sntucek, 1988). Los antioxidantes endógenos se subdividen en dos categorías, que comprenden, por un lado, a los sistemas enzimáticos (catalasa, SOD, glutathion peroxidasa, etc.) y por otro, a pequeñas biomoléculas y cofactores (glutathion, ácido úrico, coenzima Q, etc.). En base a esta clasificación, moléculas como vitamina E, vitamina C, β -caroteno etc. constituyen los antioxidantes exógenos.

En la siguiente tabla (tabla 3) se muestran algunas de las fuentes alimenticias naturales de antioxidantes exógenos.

Compuestos	Fuentes
Vitamina E	Semillas oleaginosas, aceites vegetales, nueces, granos, cereales.
Vitamina C	Frutas y vegetales, bayas, cítricos, pimientos verdes.
Carotenoides	Vegetales de hojas oscuras, zanahorias, batatas, tomates, cítricos.
Flavonoides/Isoflavonoides	Frutos y vegetales, semillas oleaginosas, bayas, pimientos, cítricos, tomates, cebollas.
Ácido fenólicos y derivados	Semillas oleaginosas, cereales, granos.
Catequinas	Té verde, bayas, ciertas semillas
Extractos/aceites esenciales	Té verde, romero, salvia, clavo, orégano, tomillo, avena, arroz.

-Tabla 3-

La clasificación que hace el "British Pharmaceutical Codex" (1979) de los antioxidantes es la siguiente:

- Antioxidantes verdaderos, aquellos que bloquean la reacción en cadena al reaccionar con los radicales libres siendo ineficaces frente radicales oxidantes.

- Antioxidantes reductores, aquellos que se oxidan más fácilmente que el sustrato que deben de proteger y son efectivos frente a radicales oxidantes.
- Antioxidantes sinérgicos, aquellos que, de por si, tienen bajo poder antioxidante, pero que incrementan considerablemente el efecto de antioxidantes verdaderos.

Más adelante aclararemos esta clasificación al explicar los mecanismos de actuación antioxidante.

Puede hacerse una última clasificación, en base a la naturaleza química de estas sustancias, en antioxidantes naturales y antioxidantes sintéticos (Santrucek et al 1988). El término "antioxidante natural" alude a aquellas sustancias que pueden extraerse de una fuente natural, ya sean plantas o tejidos animales o aquellas que puedan formarse como consecuencia del procesado de estos componentes para el alimento (Dugan 1980).

Actualmente se están incorporando a la lista de sustancias antioxidantes, una gran cantidad de compuestos que vienen a reforzar las defensas endógenas del organismo. La acción antioxidante la mayoría de ellos se conoce por estudios *in vitro*, quedando, en muchos casos todavía por determinar, su acción real *in vivo* (Auroma, 2003).

1.4.2 Mecanismos antioxidantes.

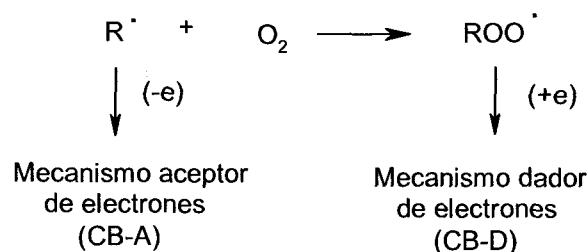
Existen distintos tipos de antioxidantes en función de su naturaleza química y mecanismo de actuación. Los antioxidantes pueden actuar directamente frente a los radicales libres o en modo sinérgico (propil galatos o ascorbil palmitato), pueden desactivar oxígeno singlete (carotenos) o complejar metales (Pospíšil, 1989).

Ya sea en el organismo o en un alimento, sin duda, el principal mecanismo de acción de los antioxidantes es mediante su capacidad para inhibir la producción de radicales libres, y de ahí su enorme importancia e implicación biológica (Rice-Evans, 1996).

1.4.2.1 Mecanismo radicalario de desactivación de radicales libres.

Considerando la reacción radicalaria de oxidación en cadena como un proceso donde un radical libre alcóxido reacciona con una molécula de oxígeno

para transformarse en un alquil-peroxil radical, vemos que existen dos modos de detener la reacción de oxidación, figura 7:



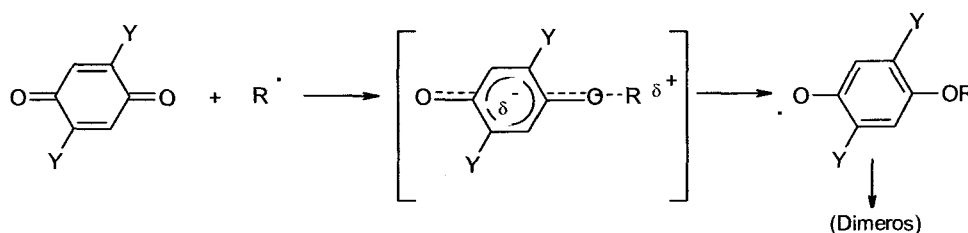
-Figura 7-

Bien mediante un proceso que implique la oxidación del radical alquilo y su transformación en un carbocatión o un derivado de este. O bien mediante la reducción del radical peroxilo a hidroperóxido. El primero de los mecanismos se denomina mecanismo aceptor de ruptura de cadena (aceptor de electrones, se entiende), (CB-A) y el segundo de ellos, mecanismo dador de ruptura de cadena.

1.4.2.1.1 Mecanismo aceptor de ruptura de cadena (CB-A).

Los radicales alquilo no son agentes oxidantes poderosos, más bien se oxidan fácilmente en presencia de aceptores de electrones. Existen numerosas moléculasceptoras de electrones capaces de eliminar eficazmente radicales alquilo del medio, proporcionando actividad antioxidante, como por ejemplo quinonas y compuestos nitrogenados.

La figura 8 esquematiza el mecanismo de actuación de estos compuestos.



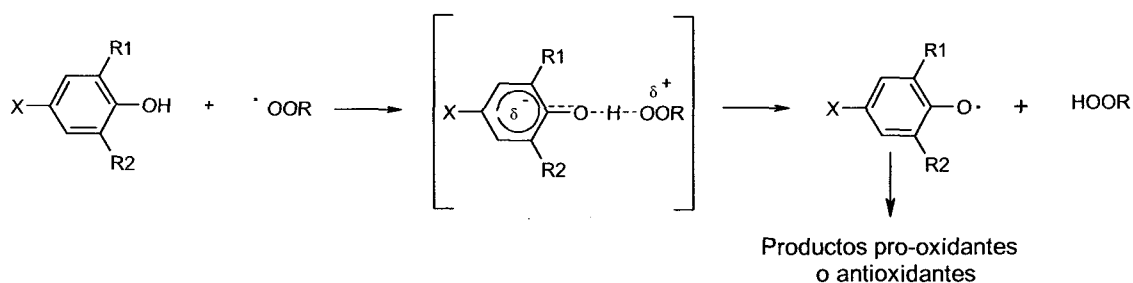
-Figura 8-

En el estado de transición de la reacción, se forma un dipolo favorecido por la presencia de grupos deslocalizadores de electrones (Y), que aumentan

la afinidad del radical por la quinona, evolucionando posteriormente a compuestos diméricos no reactivos.

1.4.2.1.2 Mecanismo dador de ruptura de cadena (CB-D).

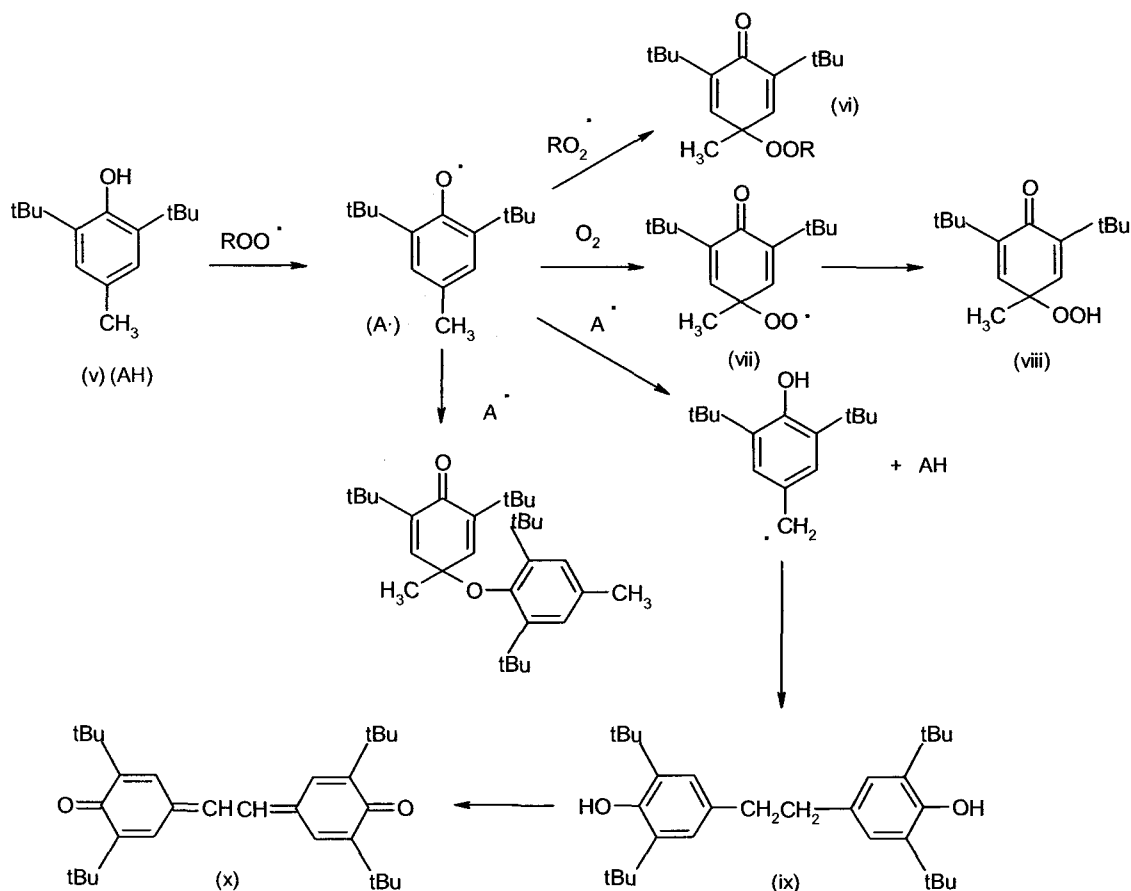
Al contrario que los radicales alquilo, los peroxil radicales de alquilo sí muestran comportamiento oxidante, tendiendo por tanto a aceptar protones de moléculas con habilidad para donar hidrógeno. Este es el comportamiento que tienen por ejemplo, los fenoles y los fenoles sustituidos con cadenas alquílicas o distintas aminas aromáticas. Los sustituyentes sobre el anillo reducen la energía del estado de transición deslocalizando la carga electrónica que se transfiere desde el radical peroxilo, figura 9. Los productos que se forman a partir del radical fenoxilo originado son complejos y pueden mostrar comportamiento tanto antioxidante como pro-oxidante.



-Figura 9-

La figura 10 representa un esquema de los productos formados durante la actuación de un fenol sustituido típico como el BHT (v). Por un lado, el etilen bisfenol (ix) que se origina por reacción con otras moléculas de BHT, es igualmente efectivo como antioxidante. La formación de la quinona estilbénica (x) resulta también efectiva, pues complementa la actuación antioxidante con un mecanismo del tipo CB-A. Pero por otro lado, se pueden originar las peroxidienonas (vi) y (viii) con potencial carácter pro-oxidante, debido al débil enlace del peróxido.

Si recordamos la clasificación que realizaba el "British Pharmaceutical Codex", los antioxidantes verdaderos se corresponden por definición con las sustancias que reaccionan a través de un mecanismo aceptor de ruptura de cadena, mientras que los reductores son los que implican un mecanismo dador.



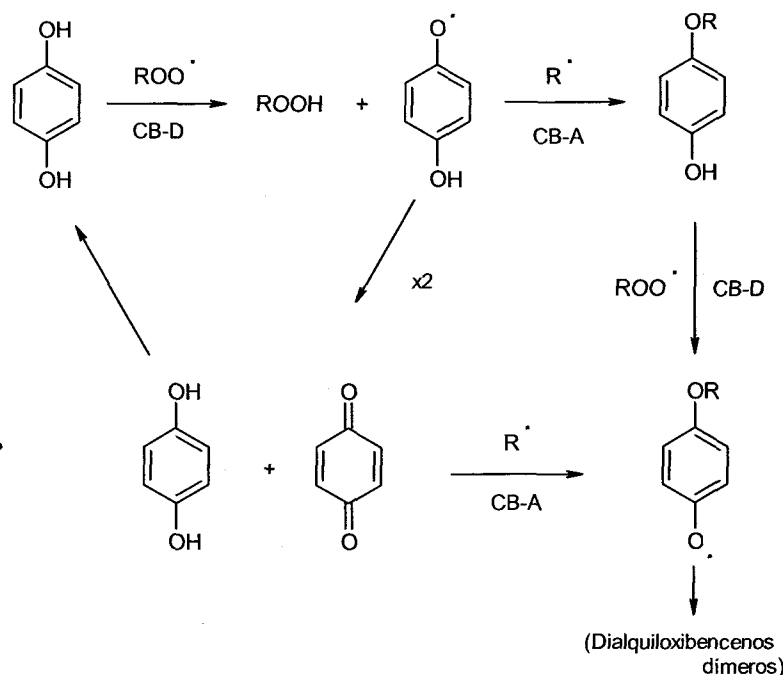
-Figura 10-

1.4.2.1.3 Mecanismo complementario dador-aceptor.

Cuando los peroxil radicales de alquilo son las especies propagadoras de la reacción en cadena presentes en mayor concentración en el sistema, o lo que es lo mismo, en presencia de exceso de oxígeno, el mecanismo CB-D es la vía más eficaz para detener la reacción radicalaria. Por contra, un mecanismo CB-A resulta más eficaz cuando existe déficit de oxígeno. Existen sustancias antioxidantes que emplean ambos tipos de mecanismos, lo cual supone una ventaja respecto a los que emplean uno solo de los mecanismos, más aún, si se tiene en cuenta que en la mayoría de los procesos oxidativos, los radicales alquilo y los peroxilo, se encuentran siempre en mayor o menor extensión.

El ejemplo mejor conocido de este tipo de sustancias con mecanismos CB-A y CB-D complementarios, lo encontramos en las hidroquinonas (o polifenoles). Como podemos ver en la figura 11, la hidroquinona, a través de un mecanismo CB-D, se transforma en benzoquinona que a su vez resulta efectiva

frente a radicales alquilo, con lo cual, se van a eliminar distintos radicales eficazmente, antes de inactivarse el antioxidante.



-Figura 11-

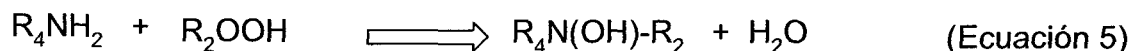
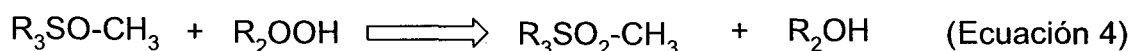
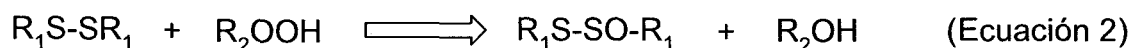
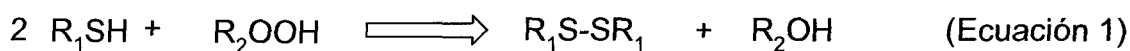
1.4.2.2 Mecanismos no radicalarios de desactivación de radicales libres.

Los antioxidantes no sólo desactivan radicales libres por mecanismos radicalarios, existen otros modos de actuación por los cuales se potencia la capacidad antioxidante de estas moléculas.

Los hidroperóxidos se pueden reducir al reaccionar con determinadas moléculas que los transforman en derivados hidroxilados menos reactivos. El mecanismo de descomposición del hidroperóxido implica una reacción S_N2 sobre el enlace del peróxido por parte de un nucleófilo. Los compuestos sulfurados y nitrogenados son en este sentido, los ejemplos mejor conocidos de compuestos que descomponen hidroperóxidos, figura 12.

Moléculas con grupos tiol, se oxidan sucesivamente, a disulfuro y ácido tiosulfínico por reacción con dos moléculas de hidroperóxido (ecuaciones 1 y 2). Igualmente, los grupos sulfuro descomponen peróxidos oxidándose a sulfóxido y posteriormente a sulfona (ecuaciones 3 y 4).

Los hidroperóxidos también pueden reaccionar con grupos amino libres formando hidroxiaminas (ecuación 5).



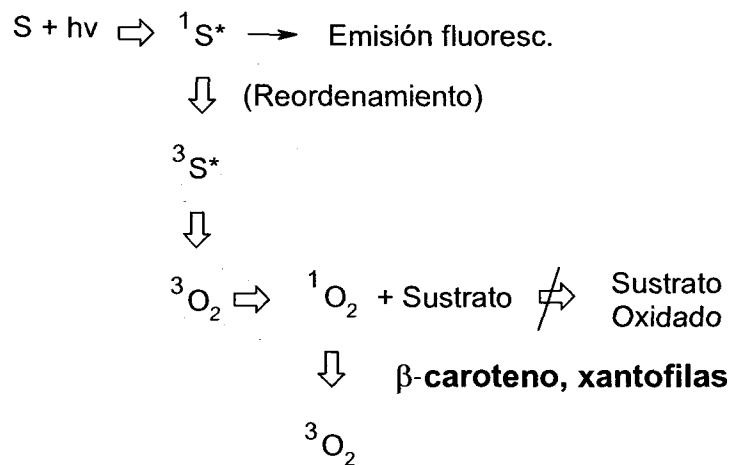
-Figura 12-

1.4.2.3 Sinergismo.

Se ha encontrado que algunas mezclas de dos o más antioxidantes funcionan mucho mejor que cada uno de sus componentes por separado a la misma dosis de la mezcla. Este efecto se conoce con el nombre de sinergismo. Efectos sinérgicos entre antioxidantes se encuentran en moléculas que actúan con mecanismos complementarios entre sí, el ejemplo más notable se encuentra entre antioxidantes con mecanismo CB-D y antioxidantes que descomponen peróxidos. Las formulaciones de antioxidantes por lo general son mezclas de ellos o mezclas de un antioxidante y un agente quelante de metales tal como el ácido cítrico o el EDTA. El ácido ascórbico y su isómero el ácido isoascórbico se suele emplear por mostrar buenas propiedades sinérgicas entre ambos. Para incrementar la solubilidad del ácido ascórbico en las grasas se suelen emplear derivados esterificados con ácidos grasos de cadena larga, que resultan tener buenas propiedades sinérgicas con los tocoferoles (Marinova et al, 1992).

1.4.2.4 Desactivación de oxígeno singlete.

Hemos visto como el oxígeno triplete se transforma en oxígeno singlete en presencia de luz y de moléculas fotosensibles, por lo que es necesaria una rápida desactivación a su estado original triplete. Los carotenos presentes en numerosas plantas son, en este sentido, las moléculas más eficaces donde el β -caroteno es el compuesto más representativo del grupo. Derivados oxigenados de los carotenos, llamados xantofilas, tienen similar habilidad para desactivar oxígeno singlete, aunque no tienen actividad provitamínica figura 13 (Lee et al, 1990).



-Figura 13-

1.4.2.5 Agentes complejantes.

Los metales, hierro, cobre, manganeso, se consideran como potentes sustancias pro-oxidantes por su capacidad para descomponer el peróxido de hidrógeno y originar radical hidroxilo. Las sustancias capaces de complejar metales reducen de forma considerable el daño oxidativo que pueden ocasionar estos metales. En la naturaleza aparecen numerosas sustancias capaces inactivar metales, como el ácido ascórbico y sus derivados, fosfolípidos, polifosfatos o determinados compuestos fenólicos (Pokorný, 1997).

1.5 ANTIOXIDANTES EMPLEADOS EN ALIMENTACIÓN.

Los antioxidantes que habitualmente se emplean en la industria alimentaria para la conservación de los alimentos son de dos tipos: antioxidantes sintéticos y antioxidantes naturales (Hudson, 1990).

1.5.1 Antioxidantes sintéticos.

Los compuestos sintéticos destinados a actuar como antioxidantes están sujetos a estrictas normas de seguridad y reglamentaciones. La única ventaja que tiene su empleo es que presentan actividades más reproducibles que los naturales, debido fundamentalmente a la variabilidad biológica de estos últimos.

Los principales antioxidantes sintéticos empleados en alimentación son el BHA, (E 320), BHT (E 321), galatos de propilo (E 310), octilo (E 311) y dodecilo (E 312), ésteres del ácido ascórbico con ácidos grasos y algunos heterociclos nitrogenados (Hudson, 1990). Además ácidos y sales inorgánicas como ácido ortofosfórico (E-338) y ortofosfatos de sodio (E-339), potasio (E-340) o calcio (E-341) (Hudson, 1990).

Cabe destacar que, aunque el ácido ascórbico, el α -tocoferol u otros antioxidantes pueden ser sintetizados, se consideran compuestos idénticos a los naturales, por tanto se discutirán dentro de los antioxidantes naturales.

1.5.1.1 Fenoles sintéticos.

Químicamente podemos decir que son compuestos fenólicos con grupos hidroxilo y metoxilo que a veces se encuentran sustituidos por cadenas alquílicas para aumentar su solubilidad en grasas además de reducir su toxicidad. Son generalmente *para* sustituidos, ya que se considera que este tipo de sustitución tiene menor toxicidad en el organismo.

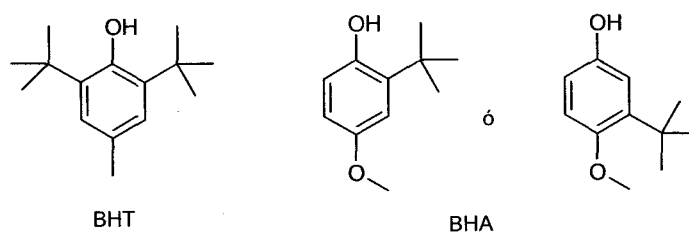
1.5.1.1.1 BHA, 2-t-butil- 4-metoxifenol (E 320).

Es un antioxidante sintético utilizado inicialmente en la industria petrolífera, empleado en alimentación a partir de los años 40 (figura 14). Es un antioxidante soluble en grasas muy estable térmicamente, empleado en productos de fritura generalmente. Usualmente se utiliza combinado con otros antioxidantes, especialmente con el BHT (E 321), ya que potencian

mutuamente sus efectos (Omura, 1993). Su utilización está autorizada en la mayoría de los países incluidos la Unión Europea y EEUU, no así en Japón. Su seguridad ha sido discutida extensamente; no tiene acción mutagénica, pero es capaz de modular el efecto de determinados carcinógenos sobre animales de experimentación, potenciando o inhibiendo su acción, en función del carcinógeno que se trate. Esto puede estar relacionado con su actividad sobre ciertos enzimas hepáticos encargados de la eliminación de sustancias extrañas al organismo (xenobióticos), que activan o destruyen a ciertos carcinógenos (Schildermann et al, 1995).

1.5.1.1.2 BHT, 2,6 di-t-butil-4-metilfenol (E 321).

También procede de la industria petrolífera, y como hemos comentado, se usa junto con el BHA, teniendo las mismas aplicaciones, y en general, las mismas limitaciones legales (Figura 14) (Omura, 1993). Las dosis autorizadas son siempre considerando la suma total de los dos. La tendencia mundial es a la reducción del uso de estos dos antioxidantes. Esta sustancia no es mutagénica, pero como el BHA, es capaz de modificar la acción de ciertos carcinógenos. Se cree que puede interferir en el metabolismo de la vitamina K, ya que produce lesiones hemorrágicas en animales de experimentación sensibles a la deficiencia de esta vitamina.

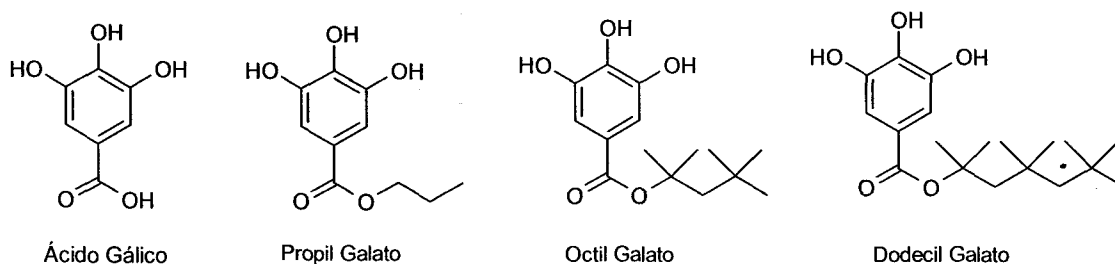


-Figura 14-

1.5.1.2 Galatos.

Son ésteres de ácido gálico con restos de propilo (E 310), octilo (E 311) y dodecilo (E 312) (figura 15), con mayor solubilidad en grasa, que se usan como antioxidantes alimentarios desde los años 40. El ácido gálico está presente en la naturaleza en numerosos vegetales, pero no sus ésteres. El principal inconveniente que presentan es su baja estabilidad térmica, por lo que son poco útiles para proteger alimentos sometidos a calor fuerte durante su

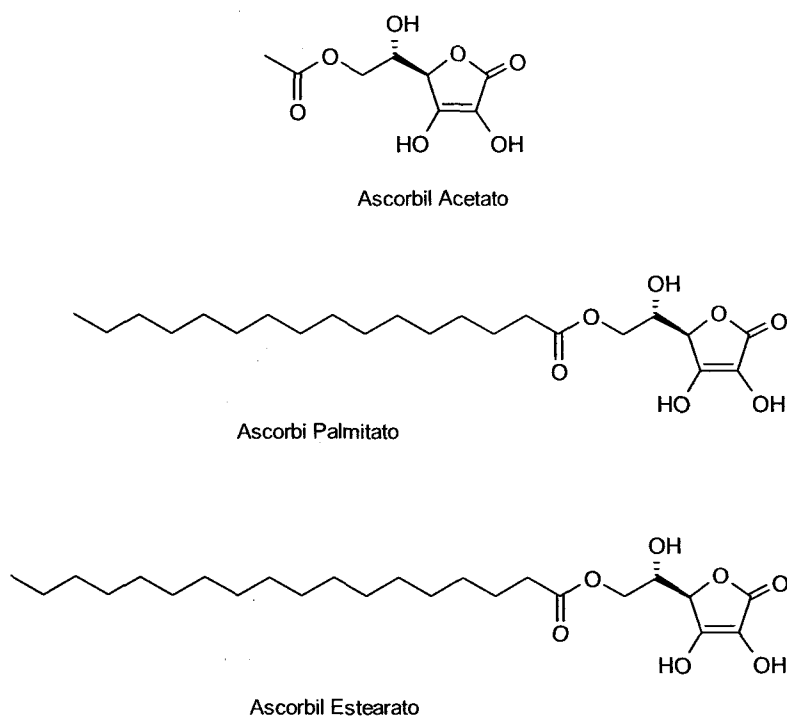
preparación. Se suelen emplear mezclados con BHA y BHT o ácido cítrico (Hudson, 1990).



-Figura 15-

1.5.1.3 Derivados de ácido ascórbico.

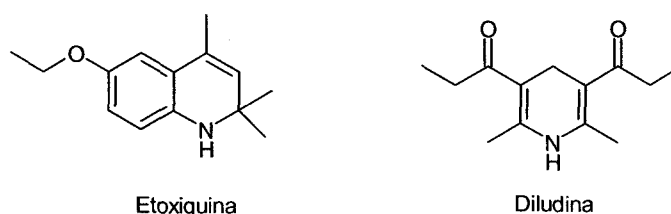
El ácido L-ascórbico (E 300), aunque está presente en numerosas fuentes naturales, el empleado en alimentación, se obtiene industrialmente por un conjunto de reacciones químicas y procesos microbiológicos. Se considera antioxidante natural, aunque se obtenga por procedimientos sintéticos. El ascorbil acetato (E 304i), el palmitato (E 304ii) y el estearato (E 304iii) se preparan fácilmente a partir del ácido ascórbico y se emplean debido a su mayor solubilidad en grasas (Figura 16). Los ascorbil ésteres se hidrolizan en el organismo dando ácido ascórbico y ácido acético, palmítico o esteárico respectivamente. Los ascorbil ésteres suelen presentar buenas propiedades sinérgicas con los tocoferoles (Hudson, 1990).



-Figura 16-

1.5.1.4 Compuestos heterocíclicos.

Algunos compuestos heterocíclicos presentan también propiedades antioxidantes. De todos ellos solamente se emplean algunos en alimentación (figura 17), como por ejemplo la etoxiquina o la diludina, que sirven para estabilizar carotenos, grasas y se utilizan también en algunas preparaciones farmacéuticas (Kourimská et al, 1993).

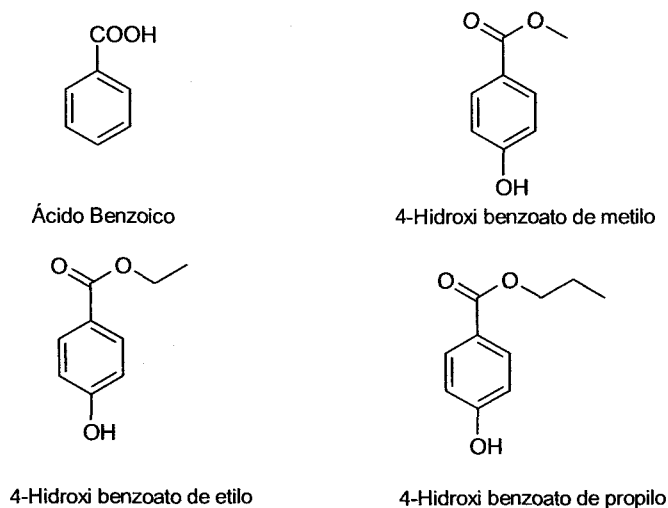


-Figura 17-

1.5.1.5 Otros.

Existen otros muchos compuestos sintéticos con propiedades antioxidantes empleados en alimentación como por ejemplo el ácido benzoico (E 210) o sus derivados etil (E 214), propil (E 216), metil (E 218) p-hidroxibenzoato y sus sales sódicas (E 215, E 217, y E 219), que aunque tienen capacidad antioxidante, son considerados como conservantes propiamente dichos, ya que poseen actividad antimicrobiana (Figura 18) (Raccachi, 1984).

Muchas sales inorgánicas (ácido ortofosfórico y polifosfatos) se emplean también con funciones antioxidantes en determinados alimentos, pero no vamos a entrar en una descripción más detallada debido a su naturaleza química, distinta a las de las moléculas objeto de este trabajo.



-Figura 18-

1.5.2 Antioxidantes naturales.

El uso de nuevas tecnologías en alimentación y de productos químicos sintéticos levanta ciertas suspicacias entre los consumidores. Los antioxidantes naturales presentan ciertas ventajas frente a los de origen sintético que en los últimos años están quedando relegados a un segundo plano (Pokorný, 1991).

Los antioxidantes más empleados en alimentación son los provenientes de fuentes naturales que sirven habitualmente como alimentos, por ejemplo compuestos antioxidantes presentes en cereales, frutas, verduras, hierbas y especias. La mayoría de los antioxidantes provenientes de fuentes naturales son compuestos fenólicos más o menos complejos. Aunque *a priori* pueden presentar menor actividad que los compuestos sintéticos, se suelen emplear extractos donde existen mezclas, que presentan efectos sinérgicos, y que pueden ir acompañados de otros tipos de inhibidores oxidativos como sustancias desactivantes de oxígeno singlete o agentes quelantes. Los productos naturales que se obtienen de extractos vegetales tienen la ventaja de estar sujetos a menores restricciones legislativas y controles de seguridad ya que sus fuentes naturales se consideran seguras y no son necesarias reglamentaciones especiales (Pokorný 1999).

Los productos naturales presentes en plantas u otras fuentes naturales que no se emplean habitualmente como alimentos, requieren regulaciones adicionales que incluyan estudios toxicológicos para comprobar su seguridad. Este es el caso de compuestos antioxidantes presentes en las hojas del ginkgo biloba por ejemplo (Shen et al, 1995). En el siguiente apartado comentaremos detalladamente las fuentes naturales empleadas para la obtención de antioxidantes.

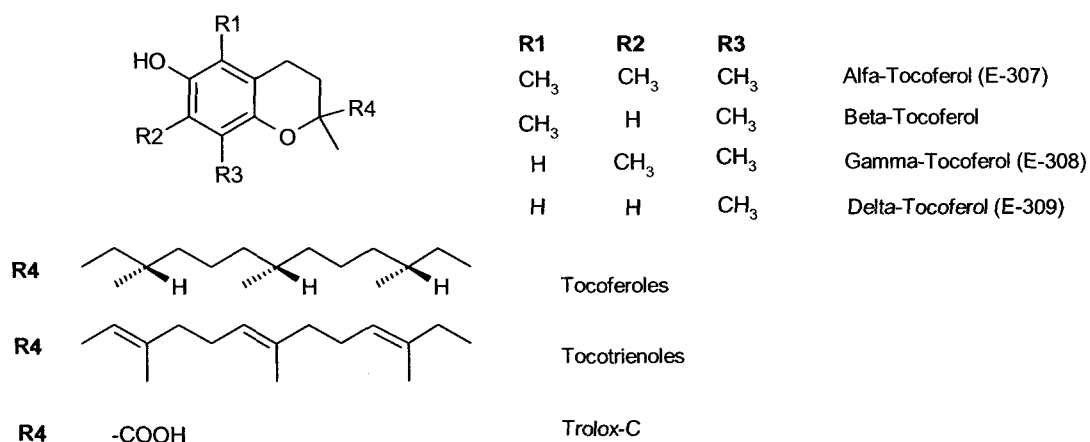
1.5.2.1 Tocoferoles.

Los tocoferoles están constituidos por un anillo bencénico sustituido condensado con un anillo de pirano, con un hidroxilo en *para* respecto al átomo de oxígeno del anillo adyacente, y una cadena lateral diterpénica. Tenemos distintos tipos de tocoferoles dependiendo de la sustitución que presente el anillo respecto a los grupos metilo (figura 19).

Los tocoferoles van acompañados en sus fuentes naturales por otros compuestos de naturaleza similar, pero que presentan dobles enlaces en la cadena lateral. De esta forma aparecen junto a dehidrotocoferoles,

tocodienoles y tocotrienoles, con uno dos y tres dobles enlaces respectivamente sobre la cadena lateral. Por último, se encuentra el trolox C, cuya cadena ha sido sustituida por un grupo carboxilo. Tiene una actividad antioxidante similar al α -tocoferol, pero mucho más hidrófilo (Mariani et al 1996).

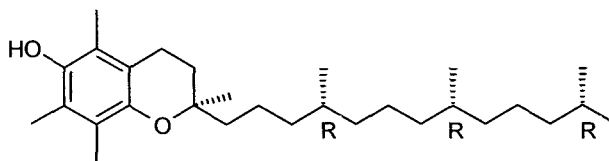
El antioxidante más importante del grupo es el α -tocoferol (E-307), también conocido como vitamina E, aunque su actividad antioxidante es menor que la de otros tocoferoles del grupo, resulta ser el que mejor se absorbe a través del intestino y posee mayor actividad in vivo (Dillard et al, 1983). La vitamina E es el antioxidante de membrana más eficaz que se conoce, previene la lesión oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados y de las proteínas ricas en grupos tiol de las membranas celulares, preservando así la integridad estructural y funcional de los orgánulos subcelulares (Kamal-Eldin et al, 1996). El ácido ascórbico (vitamina C) y el glutatión reducido pueden regenerar α -tocoferol a partir del radical tocoferoxilo; existe una interacción vitamínica donde la vitamina C, hidrosoluble, regenera a la vitamina E en la fase grasa (Niki et al, 1995). Además existen otras actuaciones sinérgicas con la catalasa, la glutatión peroxidasa y las superóxido dismutasas. La vitamina E participa en la estabilización de las membranas, la agregación plaquetaria, la hemólisis y algunas actividades enzimáticas (Kamal-Eldin et al, 1996).



-Figura 19-

Los tocoferoles empleados en alimentación pueden provenir de extractos de origen vegetal (E-306) o de procedimientos sintéticos. La vitamina E natural

y sintética no son equivalentes en composición, estructura o biodisponibilidad. La vitamina E natural (RRR α -tocoferol o d- α -tocoferol) es una entidad única (Figura 20). La vitamina E sintética es una mezcla de 8 estereoisómeros en partes iguales, sólo uno de los cuales es equivalente a la vitamina E natural.



Vitamina E

-Figura 20-

Los otros 7 estereoisómeros presentan diferentes configuraciones moleculares y actividades biológicas menores que, según ensayos en ratas, varían entre el 21% y el 90% de la actividad de la vitamina E natural (Hudson, 1990).

Los tocoferoles se obtienen como subproducto del refinado de aceites, solíendose reemplazar su contenido por tocoferol acetato sintético que presenta algunas ventajas sobre los tocoferoles libres, principalmente una mejor estabilidad oxidativa que permite mayores periodos de almacenamiento (Pokorný 1999).

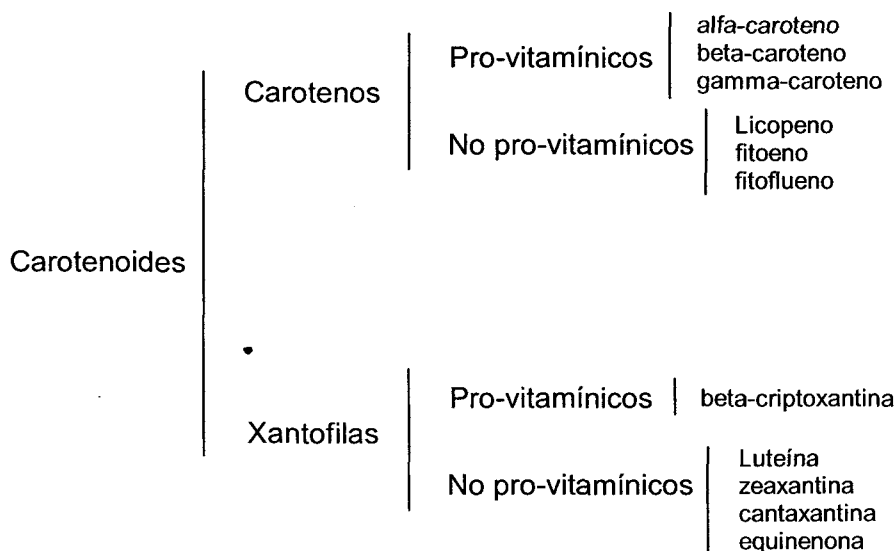
1.5.2.2 Lecitinas (E-322).

Aunque su número de código corresponde a un antioxidante, su principal función en los alimentos es como emulsionante. La lecitina se obtiene como un subproducto del refinado del aceite de soja y de otros aceites vegetales. Se encuentra también en la yema del huevo, y es un componente importante de las células de todos los organismos vivos, incluido el hombre. La lecitina comercial está formada por una mezcla de diferentes sustancias, la mayor parte fosfolípidos con acción emulsionante (fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina). Esta acción es muy importante en tecnología de alimentos, por ejemplo, la lecitina presente en la yema del huevo es la que permite obtener mahonesa que es una emulsión de aceite en agua.

Su actividad antioxidante se debe a la presencia conjunta de tocoferoles con los que ejerce buenos efectos sinérgicos.

1.5.2.3 Carotenoides.

Son hidrocarburos poliénicos biosintetizados a partir de unidades de isopreno, se conocen más de 600 y son los responsables de la pigmentación de numerosos vegetales.

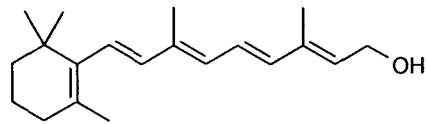


-Figura 21-

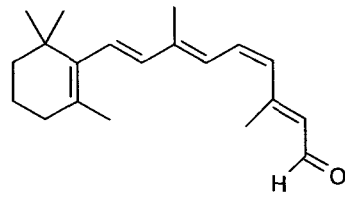
Los carotenoides tienen la capacidad de actuar como agentes fotoprotectores desactivadores de oxígeno singlete y como captadores de radicales libres. Se dividen en dos clases principales (Rojas 1996): Carotenos (hidrocarburos poliénicos puros) y xantofilas (contienen oxígeno). Algunos carotenoides son precursores de la vitamina A; por lo que se dividen a su vez en dos grandes grupos: provitamínicos y no provitamínicos siendo los más activos los beta, alfa y gamma carotenos (figura 21 y 22).

Los animales no podemos sintetizarlos y deben proveerse a través de diferentes fuentes alimentarias. El beta caroteno (E-160ii), posee fuerte actividad antioxidante y una vez absorbido en el organismo se escinde en dos moléculas de vitamina A, las formas alfa y gamma son algo menos activas. Otros, como la luteína (E-161b) o el licopeno (E-160d) son potentes antioxidantes pero no provitamínicos.

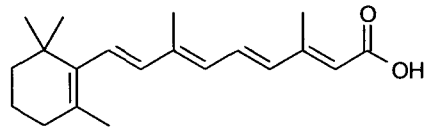
Los carotenoides que se utilizan en alimentación provienen de extractos naturales (E-160ai) o de procedimientos sintéticos, además de sus propiedades antioxidantes su empleo más habitual es como colorantes.



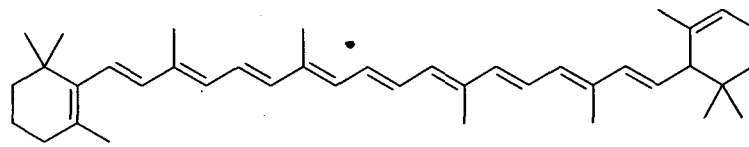
Vitamina A (Retinol)



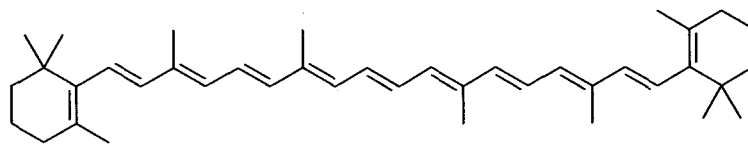
cis-Retinal



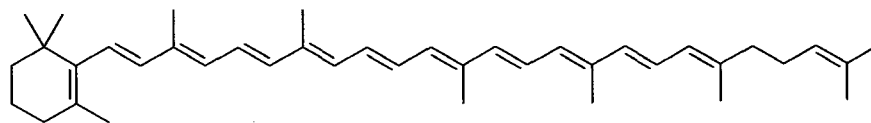
Ácido Retinóico



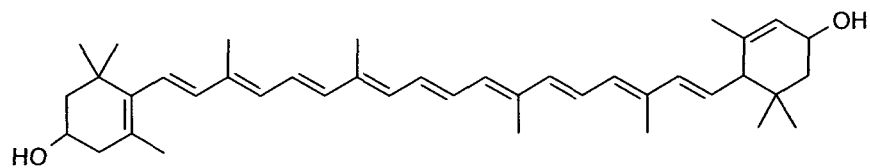
Alfa-Caroteno



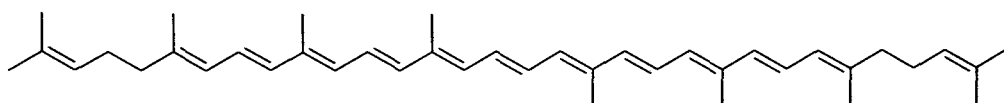
Beta-Caroteno



Gamma-Caroteno



Luteina



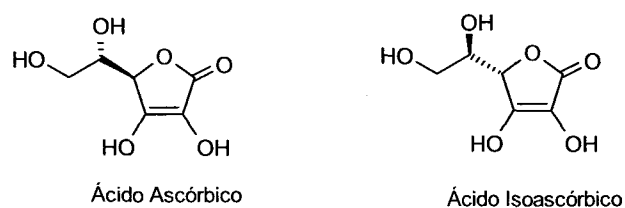
Licopeno

-Figura 22-

1.5.2.4 Ácido ascórbico.

El ácido ascórbico, también conocido con el nombre de vitamina C, es una lactona α,β -insaturada que actúa directamente frente a los radicales libres siendo el antioxidante hidrosoluble más importante del líquido extracelular (Figura 23). La vitamina C es indispensable para mantener la estructura de la sustancia intercelular del tejido conectivo ya que actúa como cofactor de las enzimas implicados en la síntesis de colágeno (Murad et al, 1981). La vitamina C además presenta acción moduladora sobre el sistema inmune y favorece la absorción intestinal de hierro (Kitts, 1997).

El ácido ascórbico se suele emplear junto con un isómero suyo el ácido isoascórbico (o ácido eritórbico, E 315), que aunque no tiene propiedad vitamínica, si presenta excelentes propiedades sinérgicas con el ácido ascórbico.



-Figura 23-

1.5.2.5 Compuestos Fenólicos

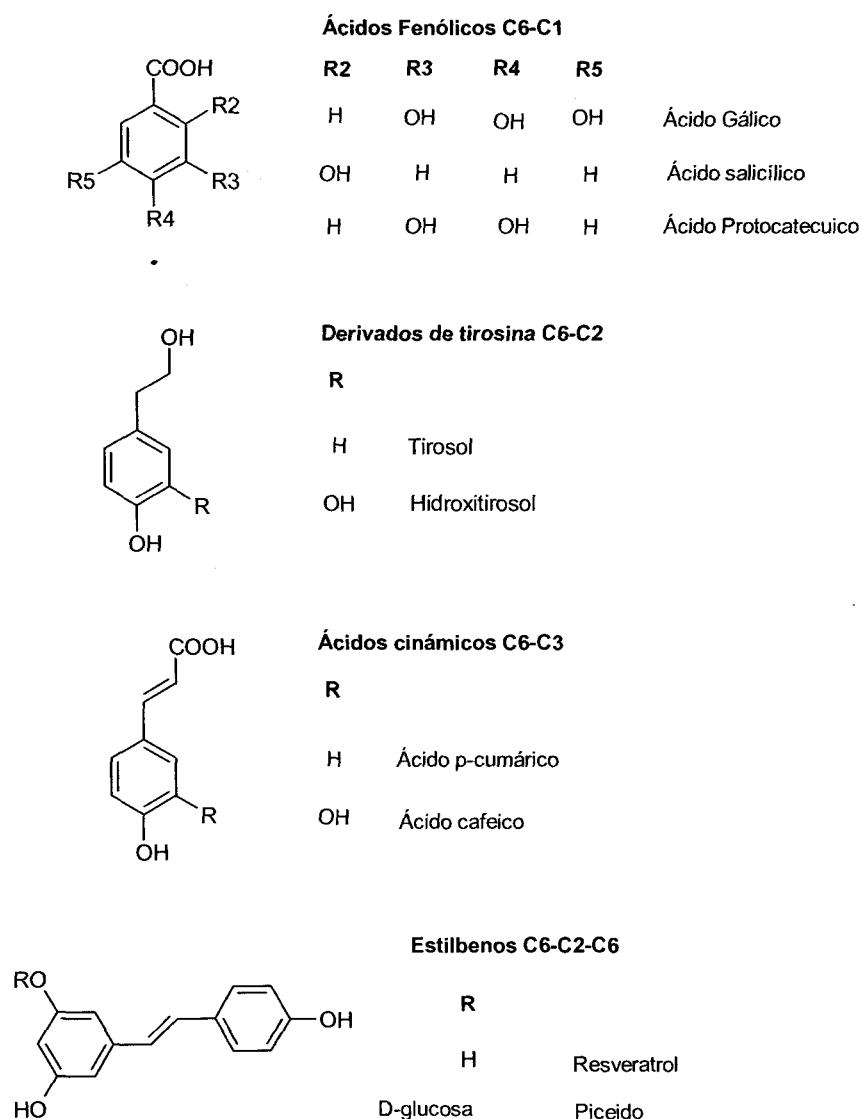
Los compuestos fenólicos son un amplio grupo de moléculas presentes en la naturaleza que posee anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilados. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes necesarios para el funcionamiento de las células vegetales (Harborne, 1989). Se encuentran ampliamente distribuidos en frutas y verduras (manzanas, cebollas), o en bebidas como el té y el vino, también en aceites de semillas y de frutos oleaginosos como el aceite de oliva (Kinsella et al, 1993, Visioli et al, 2000).

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar de acuerdo con el número de átomos de carbono del esqueleto base, en al menos 10 clases distintas (Harborne, 1989). De todas las familias de compuestos fenólicos, el grupo más numeroso lo forman los flavonoides (C6-C3-C6) donde se han identificado más de 5000 compuestos (Harborne, 1993).

Átomos de Carbono	Esqueleto	Tipo
6	C ₆	Fenoles Simples Benzoquinonas
7	C ₆ - C ₁	Ácidos Fenólicos
8	C ₆ - C ₂	Derivados de Tirosina Ácidos Fenilacéticos
9	C ₆ - C ₃	Ácidos cinámicos Fenilpropenos Cumarinas
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinones
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas
14	C ₆ - C ₂ -C ₆	Estilbenos Antraquinones
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides Isoflavonoides
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanós Neolignanós
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Bioflavonoides
n9	(C ₆ -C ₃) _n	Ligninas
n6	(C ₆) _n	Melaninas Catecólícas
n15	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos Condensados

-Tabla 4-

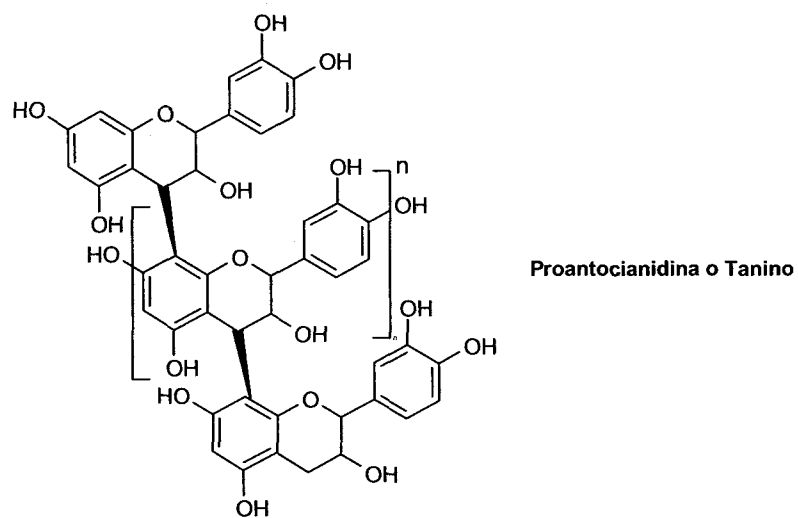
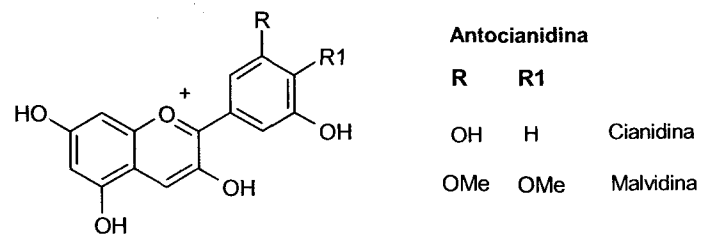
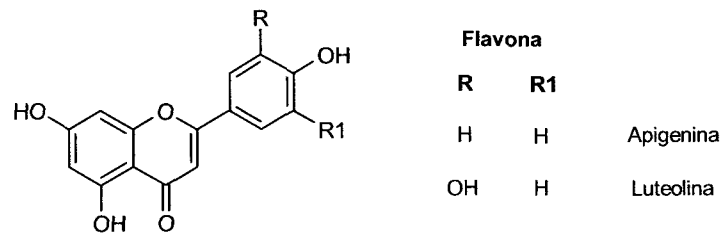
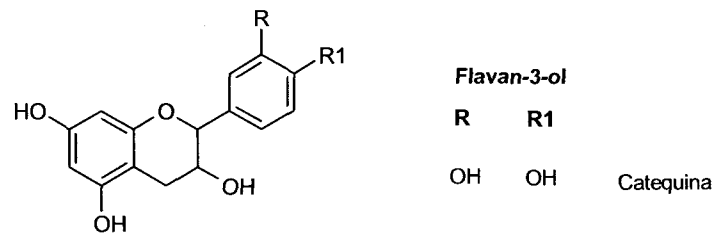
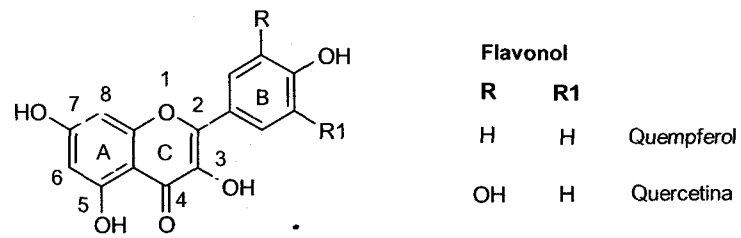
Las variaciones estructurales en los anillos subdividen a los flavonoides en las distintas familias. La tabla 4 muestra los principales fenoles identificados en nuestra dieta, las figuras 24 y 25 representan algunas de las estructuras de estos fenoles sencillos y algunas de las familias de flavonoides más habituales.



-Figura 24-

La estructura química de los fenoles es especialmente adecuada para ejercer acción antioxidante (donantes de hidrógeno o electrones, o atrapador de radicales libres) (Mathiesen et al, 1997).

En estudios *in vitro*, muchos polifenoles naturales son mejores antioxidantes que las vitaminas E y C. Además, su capacidad de quelar metales, especialmente cobre y hierro, los hace actuar indirectamente como antioxidantes ya que inhiben la acción de los metales como catalizadores en la formación de radicales libres (Conner, 1996).



-Figura 25-

1.5.3 Fuentes naturales de antioxidantes empleados en alimentación.

1.5.3.1 Aceites vegetales comestibles.

Todos los aceites comestibles como el de girasol, soja, germen de trigo etc., son particularmente ricos en tocoferoles (tabla 5), (Pokorný, 1999).

El contenido en tocoferoles por ejemplo en el aceite de soja es de 1400 mg/Kg, en el aceite de maíz 1200 mg/Kg, etc. Entre el 20 y el 50% del contenido en tocoferoles se pierde durante la refinación de estos aceites, especialmente en la etapa de desodorización, quedando un concentrado rico en tocoferoles. Lo que se suele hacer es añadir posteriormente las cantidades que se pierden a partir del concentrado que se obtiene en la desodorización.

Aceite	α -Tocoferol (mg/Kg)	β -Tocoferol (mg/Kg)	γ -Tocoferol (mg/Kg)	Tocoferoles Totales (mg/Kg)
Soja	80-150	210-780	60-400	300-1400
Colza	120-300	220-450	5-15	380-750
Girasol	550-900	25-110	0-5	580-980
Maíz	120-400	420-780	10-50	680-1250
Cacahuete	80-320	120-280	5-30	90-550
Oliva	80-180	0-5	0	80-180
Semilla algodón	550-700	200-280	0-5	800-980
Arroz	500-650	230-340	0-5	750-950

-Tabla 5-

Los tocoferoles que se añaden habitualmente a los alimentos provienen de concentrados naturales obtenidos durante la refinación de los aceites comestibles, o de procedimientos sintéticos (Pokorný, 1999).

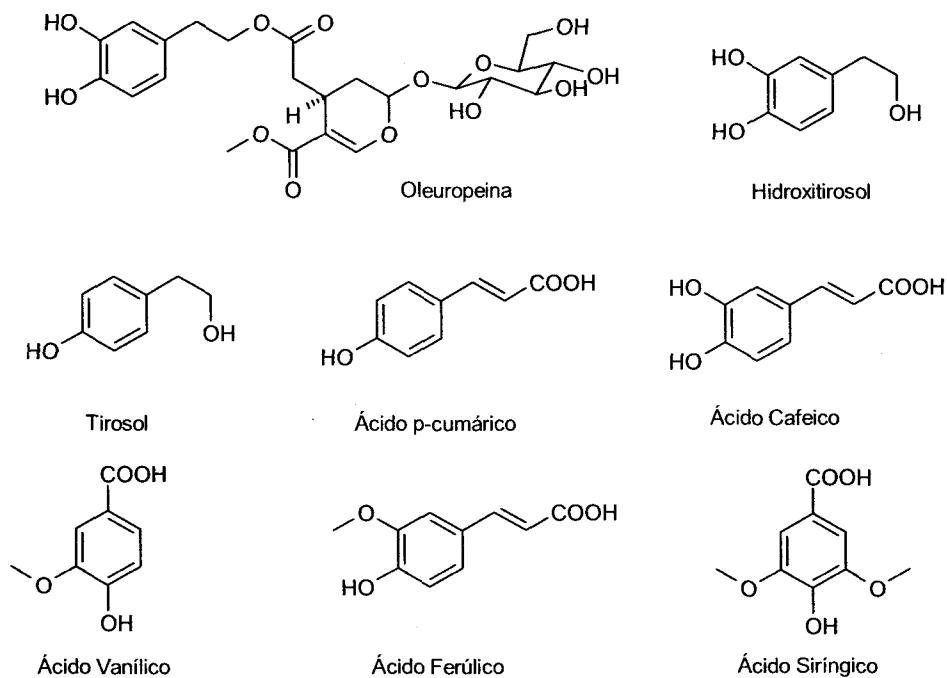
1.5.3.2 Aceites de frutos y semillas.

Algunos aceites vegetales son fuentes de otros compuestos antioxidantes de naturaleza fenólica distintos a los tocoferoles. Los compuestos fenólicos que se encuentran en las semillas y/o frutos oleaginosos son

extraídos parcialmente durante el proceso de elaboración del aceite a la fase grasa.

- Aceite de oliva.

Este es el caso por ejemplo de los antioxidantes presentes en las aceitunas. Los compuestos fenólicos se encuentran en forma de glucósidos en el mesocarpo y la piel de la aceituna principalmente, sufren, durante el proceso de elaboración del aceite de oliva, hidrólisis químicas y enzimáticas pasando una pequeña cantidad al aceite en forma de compuestos fenólicos sencillos y agliconas (Figura 26), que son en último término, los responsables de la gran estabilidad oxidativa que presenta el aceite de oliva (Boskou, 1996; Colguhoun et al, 1996)). Sin embargo, la mayor parte de los compuestos fenólicos de la aceituna no son extraídos y quedan en los residuos formando parte del orujo, el alpechín o en las aguas de lavado. Por tanto los residuos provenientes de la industria de la aceituna, pueden utilizarse como fuente de compuestos antioxidantes para la conservación de los alimentos, u otros fines (Fernández-Bolaños et al, 2002).

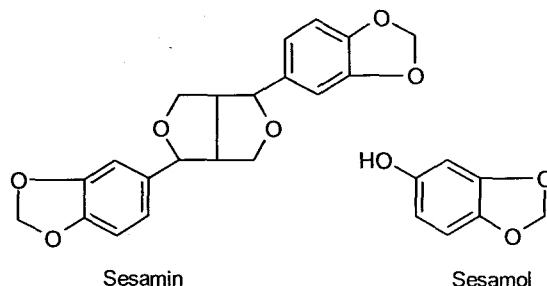


-Figura 26-

- Aceite de semillas de sésamo.

Las semillas de sésamo contienen importantes porcentajes de lignanos y productos hidrolizados que no son eliminados totalmente en proceso de refinación.

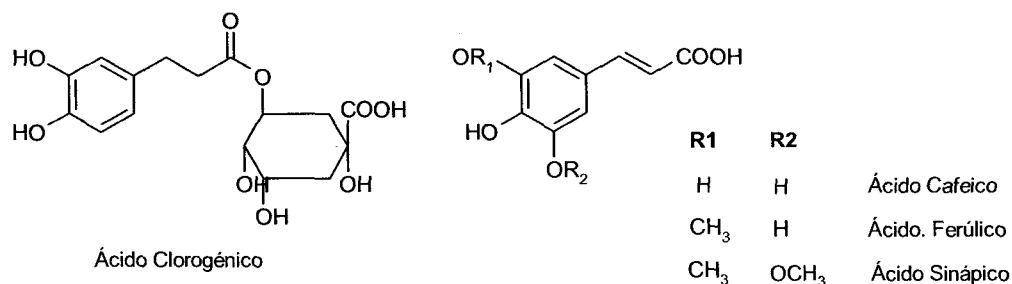
y pasan al aceite que contribuyen a mejorar su estabilidad. El principal componente es el sesamol, junto con compuestos relacionados estructuralmente como el sesamin (figura 27) (Shahidi et al, 1997).



-Figura 27-

- Aceite de semillas de girasol.

Rico en ácido clorogénico y compuestos relacionados que también son parcialmente descompuestos durante el proceso de elaboración (figura 28) (Pokorný, 1999).



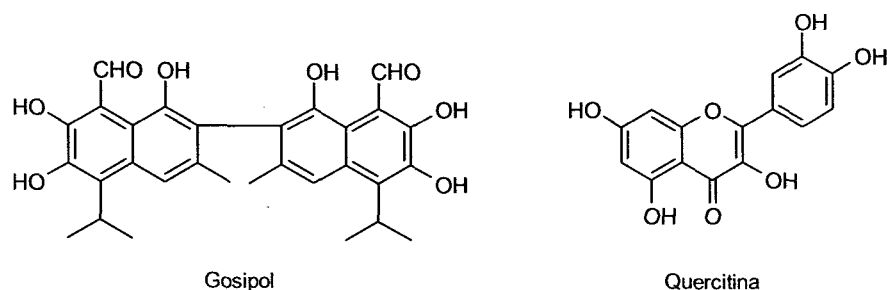
-Figura 28-

- Cacahuetes.

Contienen importantes cantidades de flavonoides, taninos y otros compuestos fenólicos de naturaleza compleja, localizados principalmente en la cáscara (Duh et al, 1992).

- Aceite de semillas de algodón.

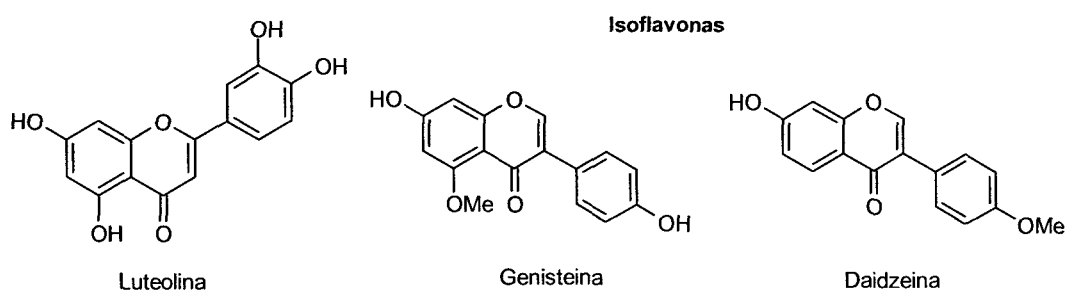
Las variedades de cultivo modernas han sido modificadas para eliminar la presencia de un compuesto fenólico tóxico, el gossipol. Es un fenol complejo, (figura 29) con grupos aldehído y estructura dímica que causa esterilidad masculina. Las nuevas variedades, libres de gossipol, mantienen cantidades importantes de flavonoides, quercitina, y tocoferoles (Whittem et al, 1984).



-Figura 29-

- Aceite de semillas soja.

Rico en flavonas e isoflavonas, es uno de los más utilizados en alimentación (figura 30). La introducción de semillas de soja genéticamente modificada con resistencia a herbicidas, ha sido el factor determinante para impulsar el cultivo de la soja por todo el mundo (Pratt et al, 1980).



-Figura 30-

- Aceite de semillas de colza.

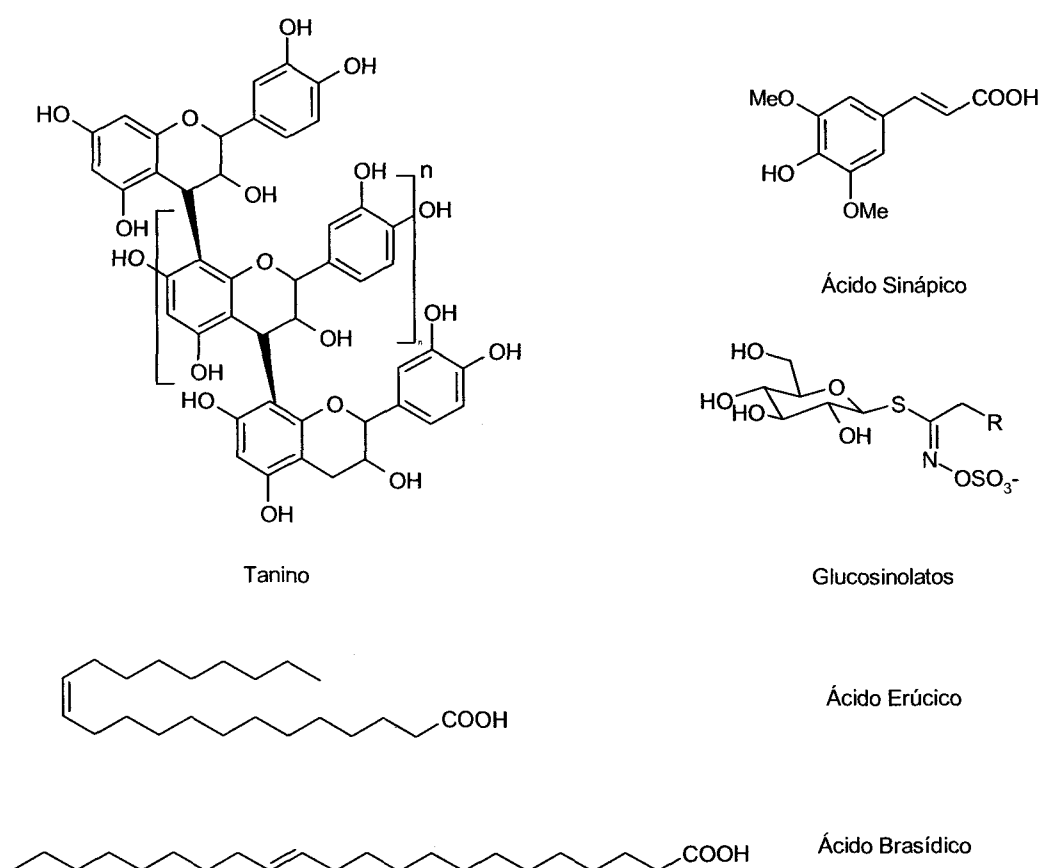
Las semillas de colza contiene principalmente taninos y derivados de sinápico, junto con otros compuestos de tipo glucosinolatos, que por hidrólisis rinden tiocianatos, isotiocianatos, nitrilos, que pueden tener efectos desagradables sobre el organismo. En el aceite de colza se encuentra también un ácido graso, el ácido erúxico, que en su forma trans, resulta tóxico para el organismo (figura 31). Las nuevas variedades de colza destinadas a la elaboración de aceites, se han desarrollado minimizando el contenido en glucosinolatos y ácido erúxico y actualmente han desplazado a las variedades originales (Pokorný, 1999). Las semillas de otras plantas de la familia de las crucíferas (col, repollo, coliflor) también se utilizan para obtener aceites destinados a consumo humano (Zadernowski et al, 1995).

1.5.3.3 Aceites de salvado de cereales y legumbres.

Los cereales son unos de los principales componentes de la dieta, contienen distintas cantidades de compuestos fenólicos especialmente en las partes del salvado (piel que envuelve el grano) y semillas.

- Aceite de avena.

Uno de los primeros cereales de los que se extrajo un concentrado rico en antioxidantes para su empleo en alimentación, fue la avena. Contiene compuestos fenólicos parcialmente unidos a lípidos que los hacen liposolubles usa en la estabilización de aceites y otros alimentos (Duve et al, 1991).



-Figura 31-

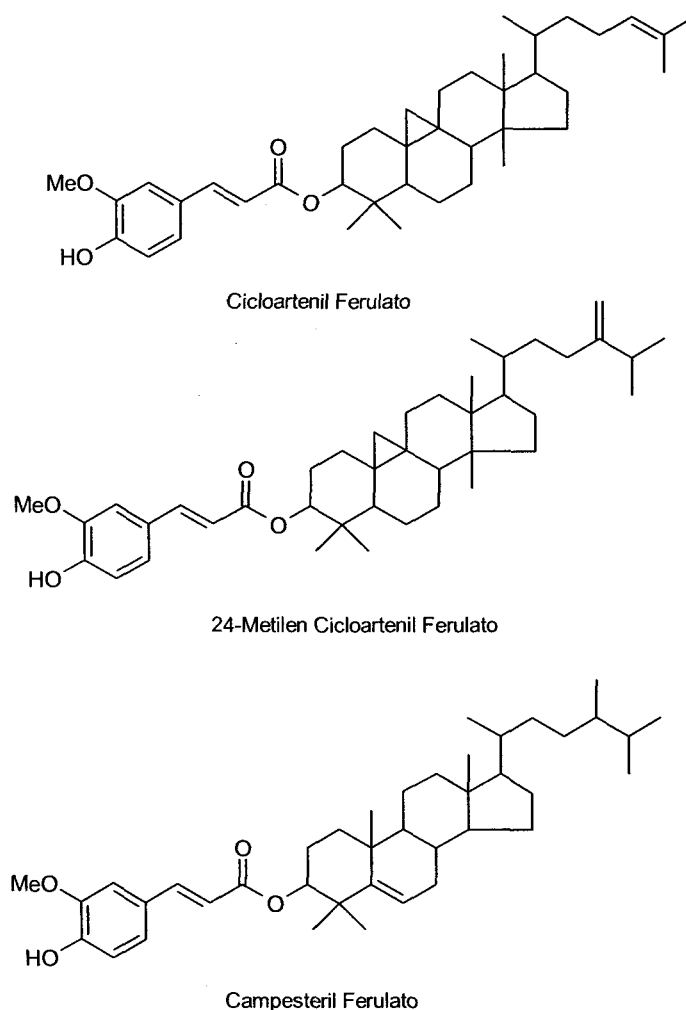
- Aceite de arroz.

El salvado del arroz se emplea para obtener aceite donde pasan compuestos fenólicos junto con tocoferoles, especialmente una mezcla de ésteres de ácido ferúlico y esteroides (campesterol, estigmasterol, sitosterol etc.) denominada γ -orizanól (figura 32) (Godber et al, 1999). Su bajo contenido en

ácidos poliinsaturados lo hace además especialmente estable, al igual que ocurre con el aceite de oliva (Diack et al, 1995).

- Legumbres.

El contenido en compuestos fenólicos de las legumbres no es excesivamente alto. Se suelen emplear en la estabilización de alimentos dosificándolos en grandes cantidades como si fueran ingredientes. Los compuestos fenólicos se acumulan principalmente en las cáscaras de las legumbres y están constituidos principalmente por flavonoles, taninos y lignanos (Troszyńska et al, 1997).



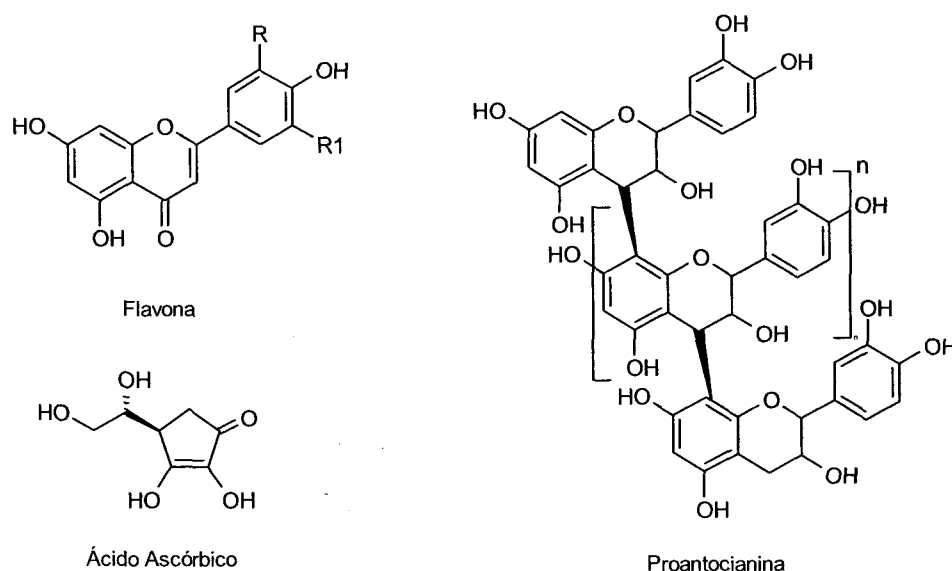
-Figura 32-

1.5.3.4 Antioxidantes provenientes de frutas y vegetales.

Las frutas contienen numerosas flavonas y compuestos relacionados, que actúan en muchos casos de forma sinérgica con la vitamina C (figura 33). Las antocianinas son compuestos solubles en agua responsables del color

oscuro del vino y de los zumos y de sus propiedades antioxidantes. Los antioxidantes con propiedades hidrofílicas presentes en las frutas (cítricos fundamentalmente) han resultado ser antioxidantes muy eficaces en medios polares y emulsionados (Pokorný, 1999).

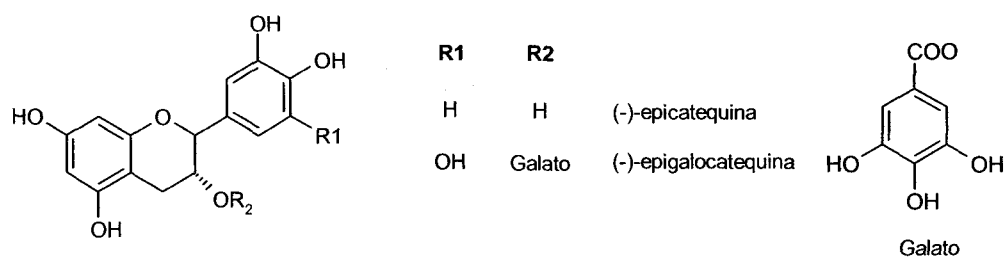
También pueden emplearse en la estabilización de alimentos, otros compuestos, de naturaleza no fenólica, presentes en los vegetales. Como por ejemplo los compuestos sulfurados que se encuentran en las cebollas y ajos. Su utilización está más restringida debido a los olores que generan, limitándose su empleo a snacks, aperitivos y ese tipo de productos (Jurdi-Haldeman et al, 1987).



-Figura 33-

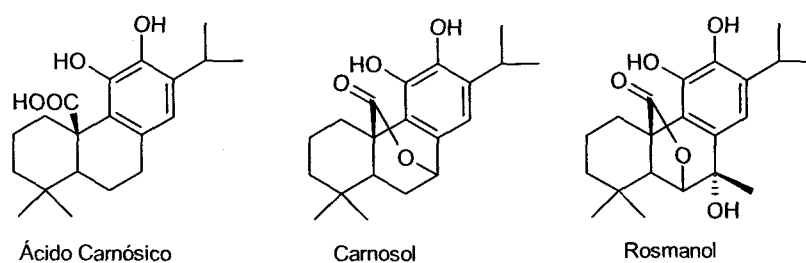
1.5.3.5 Antioxidantes provenientes de hierbas y especias.

Numerosas plantas pueden utilizarse directamente a partir de sus hojas para hacer infusiones, extractos, tisanas, etc, y utilizar su elevado contenido en compuestos fenólicos (Kasuga et al, 1988). Este es el caso, del té; sus hojas son muy ricas en catequinas, epicatequinas, galocatequinas y galatos (figura 34). Los extractos de té verde presentan actividades antioxidantes similares a los antioxidantes sintéticos y son de los más empleados para estabilizar alimentos. Los extractos antioxidantes se obtienen a partir de la infusión, o del residuo que queda su preparación (Chen et al, 1996).



-Figura 34-

Muchas de las especias que se emplean para condimentar comidas (oregano, clavo...) son muy ricas en compuestos fenólicos (flavonoides, cumarinas, fenoles...). A partir del residuo que deja la destilación de sus aceites esenciales, se obtienen extractos ricos en compuestos antioxidantes. El ejemplo mejor conocido del grupo es el extracto de romero, rico en antioxidantes como el carnosol, el ácido carnósico y otros derivados (figura 35). Por lo general, se suele añadir la especia directamente al alimento sin recurrir al aislamiento de los productos individuales. El empleo de compuestos aislados directamente de las especias suele llevar reglamentaciones especiales. La adición de especias puede alterar el sabor y olor del producto final; no ocurre así cuando las especias se emplean después de destilar los aceites esenciales con arrastre de vapor (Naketani, 1994).



-Figura 35-

1.6 APLICACIONES DE LOS ANTIOXIDANTES EN ALIMENTACIÓN.

La eficacia de un antioxidante depende no solo de la estructura de la molécula, se encuentran involucrados otros muchos factores, como la composición de la fracción lipídica, oxidantes, presencia de otros inhibidores o promotores de oxidación, cantidad de agua etc. Todos estos factores condicionan finalmente la elección del antioxidante a emplear.

1.6.1 Estabilización de grasas y aceites.

Las grasas animales, como la manteca de cerdo o la grasa láctea, contienen niveles muy bajos de antioxidantes naturales, su estabilidad frente a la oxidación es baja a pesar de su bajo grado de insaturación. Tanto antioxidantes naturales como sintéticos resultan muy eficaces en la estabilización de grasas animales, aunque generalmente, se emplean mezclas con sinérgicos. Los antioxidantes lipofílicos presentan mejores resultados, aunque también pueden emplearse antioxidantes polares.

Los aceites vegetales son más difíciles de estabilizar debido a su mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, resulta ventajoso la alta cantidad en antioxidantes naturales, principalmente tocoferoles, que presentan estos aceites comestibles. La adición de antioxidantes fenólicos en estos aceites suele mostrar eficacia limitada, siendo más habitual el empleo de sinérgicos.

Los aceites que contienen niveles altos de antioxidantes naturales, como el aceite de oliva, el de sésamo o el aceite de arroz no suelen necesitar estabilizaciones adicionales.

1.6.2 Aplicación de antioxidantes en emulsiones grasas.

La actividad que presentan los antioxidantes en emulsión es muy diferente a la que presentan en el aceite crudo. En medios emulsionados, por ejemplo mayonesas, los antioxidantes polares se extraen a la fase acuosa, lo que conlleva una pérdida de su actividad. Los antioxidantes apolares, permanecen en la fase grasa, o se acumulan en la interfase, siendo su actividad usualmente alta. De esta forma, se concluye que, antioxidantes polares son más efectivos en medios apolares y antioxidantes apolares en medios polares. Ejemplo de este comportamiento los encontramos en el caso

del Trolox frente al α -tocoferol, o con el ácido ascórbico y el ascorbil palmitato, cuando son probados tanto en aceite crudo como en emulsión.

Algunos antioxidantes de naturaleza semipolar, pueden acumularse en la interfase agua-aceite, previniendo la difusión del oxígeno a la fase grasa. La capacidad antioxidante depende también del tipo de emulsión; emulsiones de aceite en agua (O/W) se estabilizan más fácilmente que las emulsiones agua en aceite (W/O) ya que las "gotas" de aceite están aisladas del exceso de oxígeno de la fase acuosa y de la interfase.

1.6.3 Empleo de antioxidantes en alimentos.

Los alimentos deshidratados, como sopas, leche en polvo, etc., son muy sensibles a la oxidación ya que el oxígeno tiene acceso directo a las partículas de lípidos. La estabilización es poco eficaz, la velocidad de iniciación de la reacción de autooxidación es alta y los antioxidantes se inactivan rápidamente.

Proteínas y otros muchos componentes de los alimentos también ejercen función protectora actuando como sinérgicos de otros inhibidores, aumentando su efecto antioxidante. También se encuentran de forma natural en los alimentos, sustancias complejantes, al igual que metales pesados provenientes de hemo derivados.

En los alimentos que contienen agua, la fracción lipídica suele ser relativamente estable, encontrándose protegida del exceso del oxígeno del aire, por capas de proteínas o carbohidratos. La adición de antioxidantes lipofílicos es efectiva, mientras que los antioxidantes polares podrían pasar a la fase acuosa, perdiendo su actividad, similar a lo que ocurre en el caso de las emulsiones.

También se suelen emplear antioxidantes en los materiales destinados al envasado para evitar la difusión del oxígeno hasta el alimento.

De cualquier forma, debido a la complejidad de la composición de los alimentos, es necesario probar distintos antioxidantes y evaluar su eficacia en cada caso particular.

1.6.4 Niveles legales permitidos de antioxidantes.

El empleo de antioxidantes sintéticos se encuentra restringido a muy pocos compuestos, los cuales han pasado complicados y costosos experimentos para probar su seguridad. Estos experimentos incluyen pruebas

que demuestren que no provocan malformaciones fetales ni cáncer en al menos tres especies distintas de animales de laboratorio y una de ellas no roedor. En cualquier caso, la adición de antioxidantes está restringida al 0.02% de la cantidad total de grasa. Los antioxidantes permitidos varían de un país a otro, y siempre sujeto a cambios; algunos ejemplos se muestran en la tabla 6. En la práctica, resulta ventajoso el empleo de mezclas, que generalmente presentan mayor actividad que los componentes por separado, y garantiza que no se excede el límite legal de los compuestos por separado.

Muchos compuestos naturales están generalmente considerados como seguros (GRAS) y su empleo no está restringido por la legislación, este es el caso por ejemplo de los compuestos fenólicos, fosfolípidos, aminoácidos etc., presentes en extractos naturales. El uso de especias tampoco está sujeto a restricciones legales. Para compuestos puros, aislados de fuentes naturales que habitualmente se emplean como alimentos o no, se debe comprobar que no existen riesgos en su empleo mediante estudios de toxicidad.

Antioxidante	Aplicación
Propil Galato	Grasas y aceites
Dodecil galato	Grasas y emulsiones
BHT	Grasas, aceites y alimentos
BHA	Grasas, aceites y alimentos
Di-t-butilhidroquinona	Aceites vegetales y de pescado
Ascorbil Palmitato	Aceites vegetales, sinérgico
Tocoferoles	Grasas y aceites
Ésteres de ác. Cítrico	Sinérgico, aceites comestibles
Lecitinas	Sinérgico
Carotenos	Aceites comestibles y emulsión
Aceite de silicona	Aceites de fritura

-Tabla 6-

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

2.1 ELECCIÓN DE LAS MOLÉCULAS A SINTETIZAR.

El interés por los antioxidantes naturales continua creciendo por diversos motivos. Principalmente, por ser sustancias que se encuentran de forma natural en los alimentos y se llevan consumiendo desde hace cientos de años, por tanto se consideran seguras, evitando las pruebas de seguridad a las que se someten los compuestos de síntesis.

Las plantas son capaces de sintetizar una gran variedad de moléculas orgánicas que desempeñan numerosas funciones, desde soporte estructural hasta funciones defensivas. Este variado abanico de moléculas se conocen generalmente con el nombre de metabolitos secundarios. Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios que se encuentran más ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal.

El término "compuestos fenólicos" comprende aproximadamente unos 8000 compuestos naturales todos ellos con una característica estructural común: Un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo (fenol).

La clasificación actual divide a los compuestos fenólicos en dos familias, denominadas polifenoles y fenoles sencillos, basada exclusivamente en el número de anillos fenólicos presentes; Los polifenoles poseen al menos dos unidades de fenol e incluyen a los flavonoides y a los compuestos con más de tres subunidades de fenol denominados taninos.

Los compuestos fenólicos forman parte de los materiales de soporte de la estructura celular en las plantas, participan de la coloración de flores y frutos para hacerlos atractivos a los insectos y pájaros, contribuyendo a la polinización y a la dispersión de las semillas. Además los compuestos fenólicos son importantes en los mecanismos de defensa celular frente a diferentes condiciones de estrés ambiental como infecciones o exceso de luz y radiación ultravioleta. La potencialidad biológica de estos segundos metabolitos se basa en su capacidad para actuar como antioxidantes de los sistemas biológicos.

A parte del papel que juegan los compuestos fenólicos en la vida de la planta, la atención de numerosos investigadores se ha centrado hacia el campo de la calidad alimentaria. Los compuestos fenólicos se asocian con el color, los

atributos sensoriales y las propiedades nutricionales y antioxidantes de los alimentos. La industria alimentaria se ha interesado en los últimos años en el efecto que estos compuestos juegan en la maduración de la fruta, el oscurecimiento de los alimentos por procesos enzimáticos y en general, en su papel como antioxidantes de los alimentos.

Generalmente, cuando se habla de compuestos fenólicos, los flavonoides son la clase que predominantemente se describe, ya que estos compuestos componen prácticamente los dos tercios de los fenoles totales de la dieta. El otro tercio restante está compuesto casi en su mayoría por fenoles sencillos, principalmente ácidos fenólicos derivados de cinámico y benzoico, habiendo un creciente interés en el conocimiento de su comportamiento antioxidante y de los beneficios asociados al consumo de estos fenoles sencillos.

La actividad antioxidante de los estos compuestos fenólicos la ejercen principalmente en el medio acuoso de los sistemas biológicos debido a su naturaleza hidrosoluble. Esta naturaleza hidrofílica les supone una importante restricción a la hora de utilizarlos en medios hidrofóbicos como los aceites. La esterificación de los compuestos fenólicos con cadenas alifáticas puede servir como herramienta para alterar sus propiedades físicas de la molécula, solubilidad, miscibilidad y su actividad antioxidante en el medio lipofílico o emulsionado (Buisman et al, 1998; Pokorný 1999).

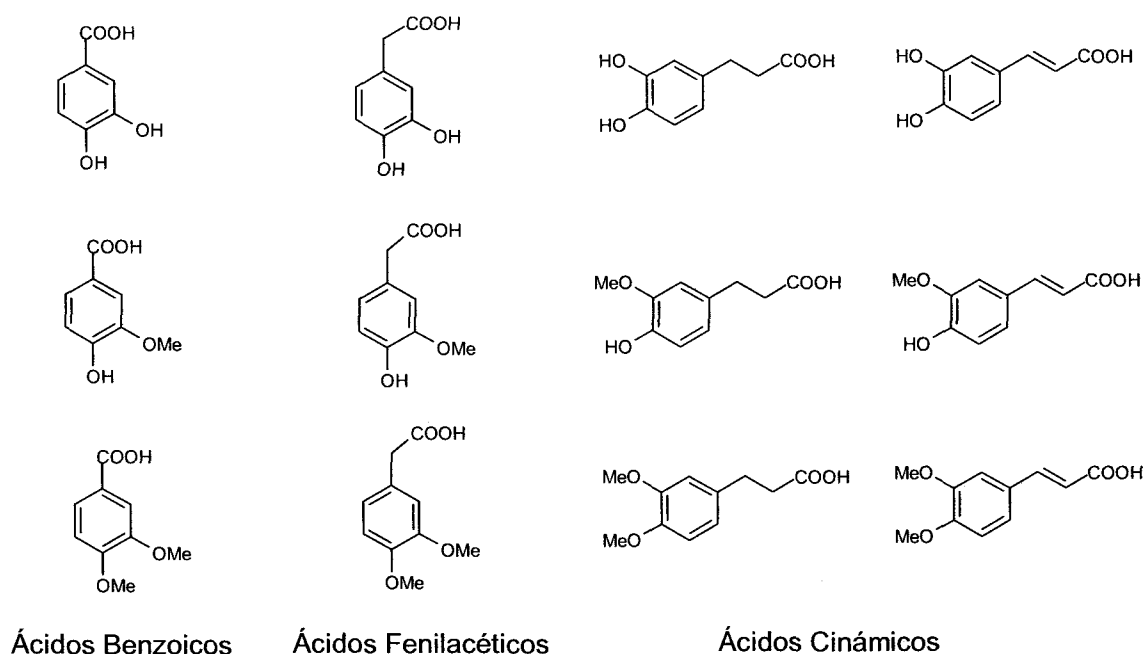
La actividad antirradicalaria de los compuestos fenólicos depende de su estructura molecular. Estudios preliminares realizados por distintos autores sobre las relaciones estructura-actividad antioxidante sobre distintos ácidos cinámicos y derivados (Moon et al, 1998; Chen et al, 1997), apuntan hacia distintas características estructurales que favorecen la actividad antioxidante de estas moléculas:

- La presencia de cadenas conjugadas en posición *para* del hidroxilo fenólico, produce la deslocalización del radical fenoxilo produciendo estabilización en la molécula y ganancia de actividad (Graf et al, 1992).

- La presencia de grupos dador de electrones en *orto* (-OMe), favorece la estabilización del radical fenoxilo incrementando la eficacia antioxidante. (Cuvelier et al, 1992; Terao et al, 1993).
- La presencia de un segundo grupo hidroxilo en *orto* o en posición *para*, aumenta la actividad antioxidante gracias a estabilizaciones adicionales por resonancia y formación de o-quinona y p-quinonas (Dziedrich et al, 1984; Pekkaninen et al, 1999)

El objetivo principal de este trabajo es la síntesis de antioxidantes lipofílicos derivados de compuestos fenólicos para su aplicación en la industria alimentaria en la estabilización de las grasas y emulsiones que forman parte de los alimentos.

La elección de las moléculas a sintetizar la vamos a realizar conservando los criterios de relación actividad-estructura dados por otros autores. De esta forma las moléculas fenólicas elegidas van a poseer hidroxilos en posición *orto*, cadenas en *para* a uno de los hidroxilos y/o sustituciones con grupos dadores de electrones en el anillo, estableciéndose las familias de ácidos benzoicos, fenil acéticos y cinámicos como punto de partida de las investigaciones que constituyen el objetivo principal este trabajo, figura 36.



-Figura 36-

La única posición de la molécula donde podemos realizar modificaciones, manteniendo los criterios estructurales anteriores, es en el extremo de la cadena, sobre el grupo carboxilo. Existen referencias de derivados esterificados de ácidos cinámicos con fenoles o alcoholes alifáticos de distinta longitud con propiedades antioxidantes (Borges et al, 2000; Kikuzaki et al, 2002; Appendino et al, 2002), pero creemos más conveniente sintetizar derivados a partir de un grupo hidroxilo en esa posición y esterificarlo con ácidos grasos.

Alcoholes fenólicos de este tipo, se encuentran también localizados en distintas partes de la planta y constituyen intermedios biosintéticos muy importantes en la síntesis de flavonoides, taninos, ligninas y secoiridoides, entre otros.

El empleo de ácidos grasos como sintones no supone un inconveniente ya que son moléculas que se consideran seguras y se dispone de numerosas y variadas fuentes naturales de obtención.

Con la introducción de restos de ácidos grasos vamos a disponer de un procedimiento para solubilizar en grasas moléculas antioxidantes de características polares, proceso de claro interés en la industria alimentaria. Dependiendo del tipo de ácido graso y del fenol, dispondremos de moléculas con distintas solubilidades y propiedades antioxidantes que nos permitirán distintas aplicaciones de las mismas. La esterificación de ácidos insaturados o poliinsaturados (líquidos a temperatura ambiente) va a traducirse en una disminución del punto de fusión de los productos que va a facilitar el manejo práctico de los antioxidantes a la hora de su inclusión en un alimento.

En los últimos años existe además un creciente interés en los distintos tipos de grasas que se consumen en la dieta y su efectos principalmente sobre las enfermedades cardiovasculares. Como consecuencia de esto, ha aparecido el concepto de grasa saludable que comprende a todas aquellas grasas que aportan beneficios al organismo como los ácidos grasos de cadena corta, monoinsaturados y poliinsaturados (Mataix 2001). Debido a que este tipo de moléculas son más susceptibles de sufrir procesos oxidativos, la esterificación junto a la molécula de antioxidante puede resultar además un método efectivo para proteger intrínsecamente a estas moléculas de la oxidación.

2.2 OBJETIVOS.

Las moléculas elegidas como productos de partida son distintos ácidos benzoicos, fenil acéticos y cinámicos, que poseen propiedades antioxidantes puestas de manifiesto en numerosas ocasiones por otros autores que van a servir para alcanzar distintos objetivos:

1.- Se pretende realizar la reducción del ácido carboxílico a fin de obtener sus correspondientes alcoholes, ya que en la mayoría de los casos, no se encuentre disponibles comercialmente, figura 37.

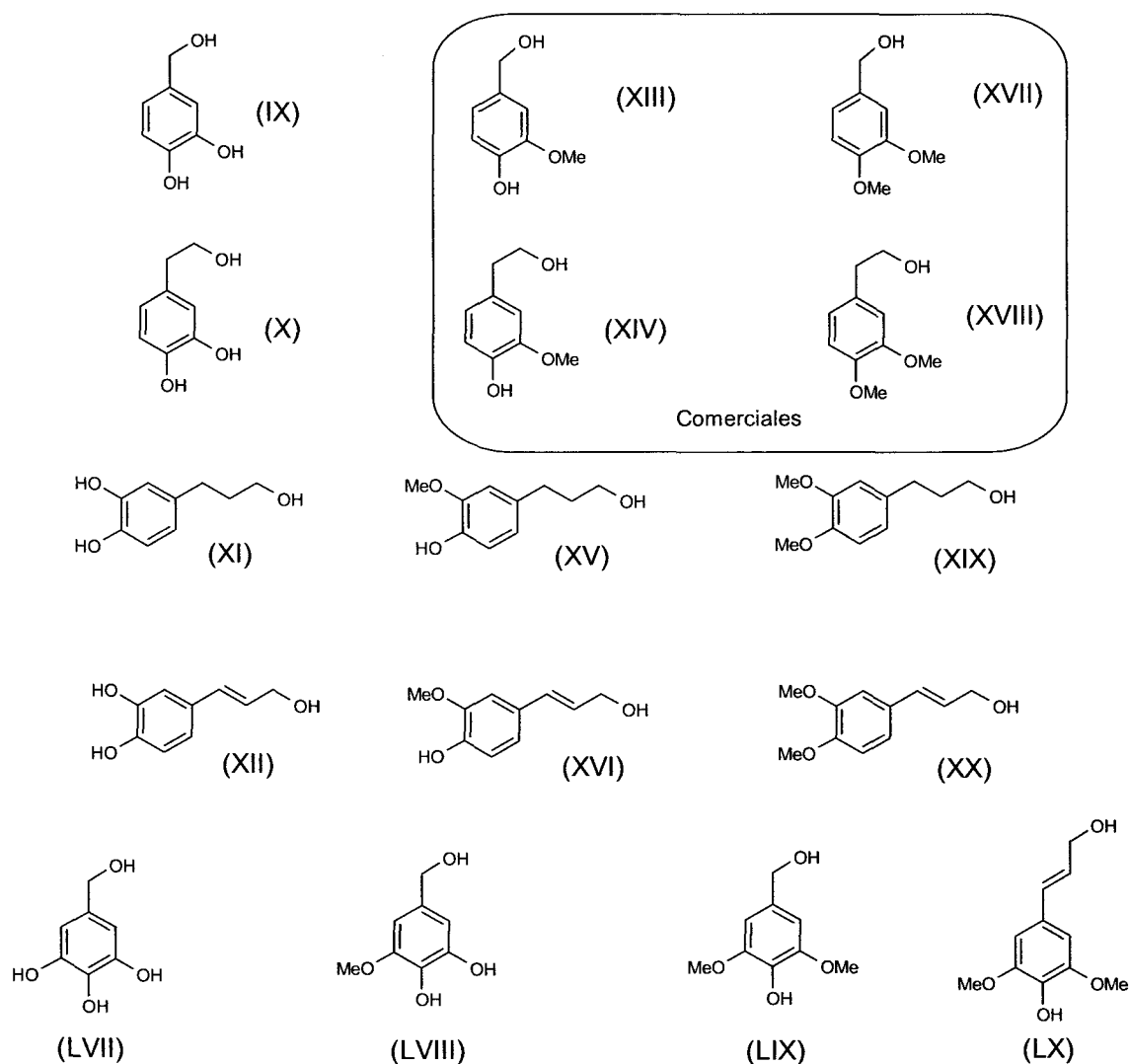
2.- Realizar estudios experimentales de capacidad antioxidante para determinar como afecta a la actividad antioxidante del catecol, la longitud de la cadena alifática, la presencia de dobles enlaces conjugados, el número de grupos hidroxilo del anillo o la presencia de grupos metoxilo.

3.- Seleccionar entre todas ellas, las que proporcionen mejores resultados de actividad antioxidante y esterificarlas químicamente a ácidos grasos de distinta longitud y naturaleza (C4, C16, C18, C18:1, EPA y DHA) para obtener una gama completa de compuestos que exhiban distintas propiedades antioxidantes y de solubilidad tanto en fase grasa como en medio acuoso y/o emulsionado.

4.- Desarrollar métodos enzimáticos para la obtención de los antioxidantes lipofílicos objetivo de este trabajo. El empleo de productos de síntesis química en alimentación está sometido a rigurosas reglamentaciones en lo que se refiere a los reactivos permitidos, disolventes y condiciones de reacción a utilizar para su obtención. Por tanto, debemos de buscar un procedimiento de obtención que se considere "limpio" a la hora de producir este tipo de moléculas para su inclusión en alimentos. Las reacciones enzimáticas, pueden considerarse en último extremo como naturales por lo que su aplicación en la industria alimentaria ha aumentado considerablemente en los últimos años.

5.- Determinar la propiedades antioxidantes, solubilidad y aplicación a la estabilización de grasas y emulsiones de las nuevas moléculas y compararlas con las de antioxidantes que se emplean habitualmente a fin de evaluar su posible inclusión en alimentación.

6.- Realizar un estudio mediante química computacional del comportamiento antioxidante que cabría esperar en base a los datos experimentales y energéticos de los alcoholes fenólicos de partida. Se pretende encontrar datos teóricos que correlacionen actividad y estructura para predecir qué distribución de grupos funcionales va a originar las moléculas más activas y disponer de una herramienta eficaz para la búsqueda de nuevas moléculas.



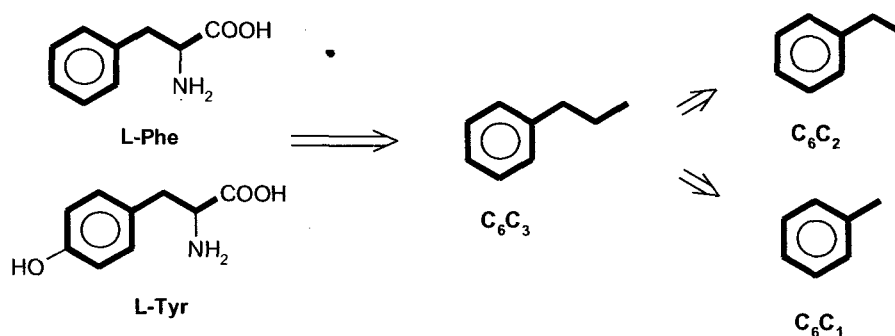
-Figura 37-

ANTECEDENTES

3. ANTECEDENTES.

3.1 BIOSÍNTESIS DE FENILPROPANOIDES EN PLANTAS.

La mayoría de los compuestos fenólicos de las plantas superiores surgen a través de la ruta de conocida como biosíntesis de fenilpropanoides, como consecuencia del metabolismo de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, que constituyen los principales intermediarios biosintéticos en la ruta del ácido sikímico, figura 38.



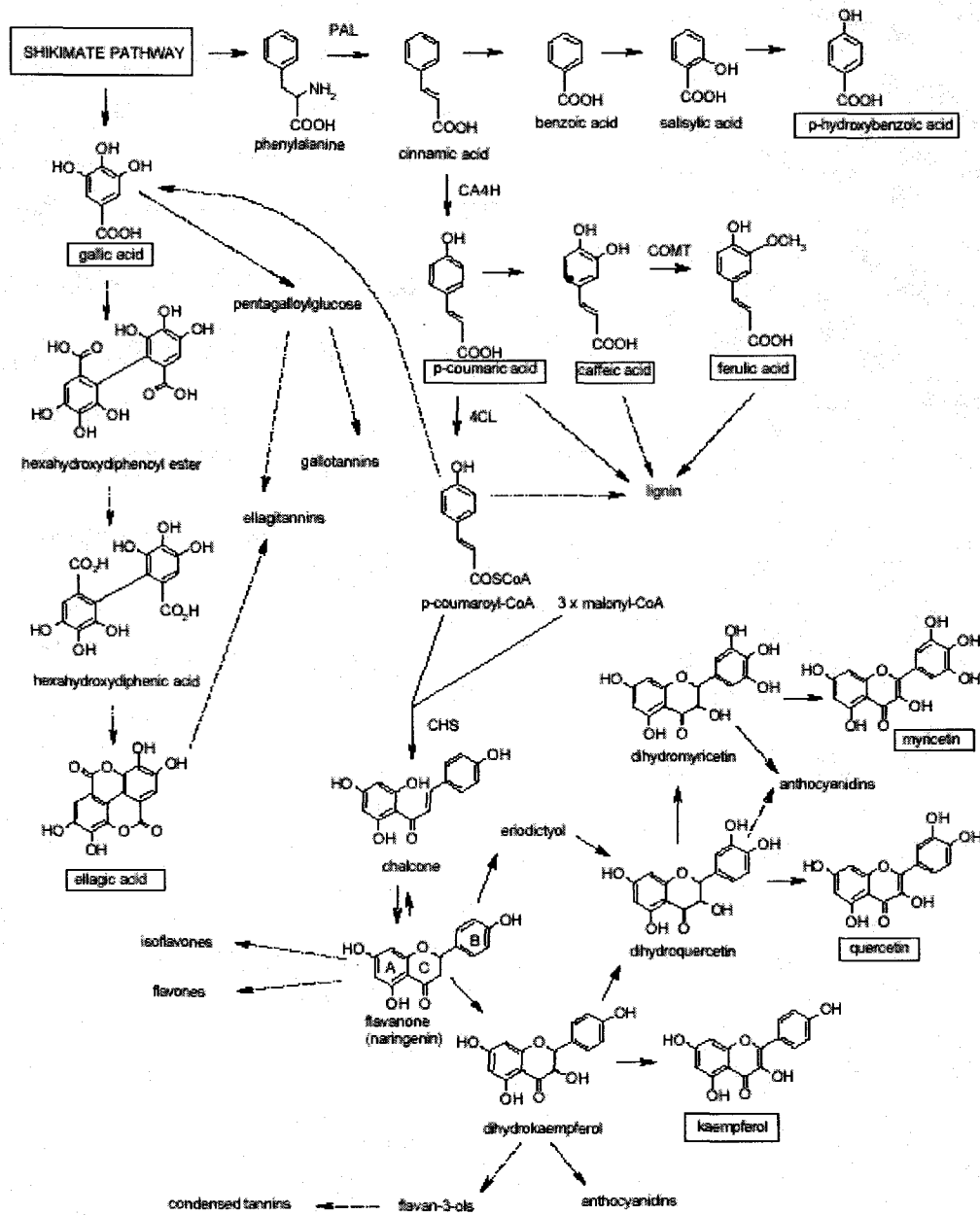
-Figura 38-

La unidad estructural de fenilpropano C₆C₃ que se encuentra en muchos compuestos naturales (ácidos cinámicos, cumarinas, lignanos o flavonoides) proviene del esqueleto de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina. La biosíntesis de fenilpropanoides requiere la pérdida del grupo amino. La cadena C₃ puede ser saturada o insaturada y a veces oxigenada. Es frecuente encontrar degradaciones en la cadena, con pérdida de uno o dos átomos de carbono originando las unidades acortadas C₆C₂ y C₆C₁ que se consideran como parte del sistema C₆C₃.

La figura 39 esquematiza la biosíntesis de los principales ácidos hidroxicinámicos, hidroxibenzoicos y flavonoides encontrados en las plantas superiores.

El primer paso de la biosíntesis de fenilpropanoides es la desaminación estéreo específica de la fenilalanina, generándose el doble enlace *trans* del esqueleto cinámico. La hidroxilación del anillo sobre la posición 4 origina el esqueleto del ácido p-cumárico. Otros pasos involucran hidroxilaciones adicionales del anillo y metilaciones que originan los ácidos cafeico, ferúlico,

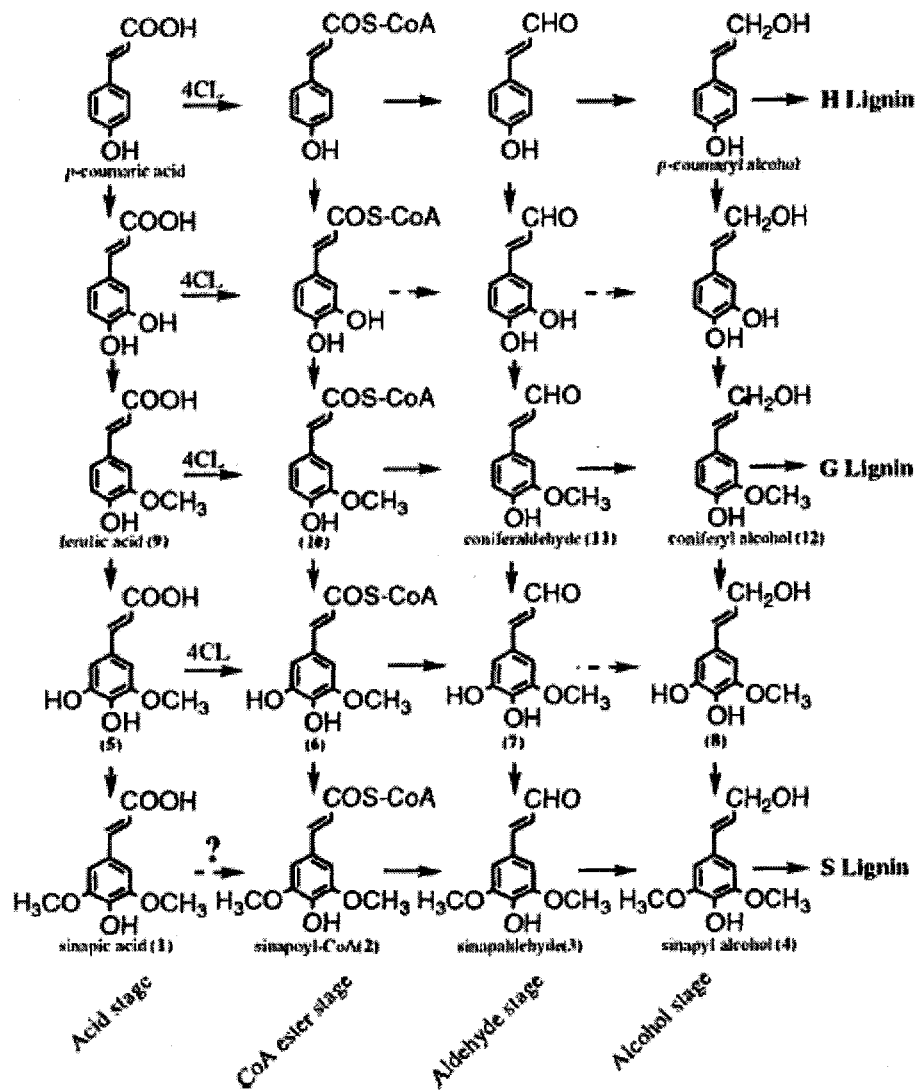
sinápico, etc. Los ácidos benzoicos se originan principalmente por degradación de la cadena lateral por pérdida de un acetato a partir de los correspondientes ácidos hidroxicinámicos. Aunque se ha propuesto una vía alternativa para la biosíntesis de ácidos benzoicos a partir una ramificación desde la ruta del sikímico.



-Figura 39-

Los ácidos cinámicos participan también en la biosíntesis de ligninas, polímeros estructurales basados en el esqueleto C_6C_3 . Las ligninas se forman por acoplamiento oxidativo de los alcoholes hidroxicinámilicos originados por

reducción del éster con el coenzima A, y del aldehído a partir de los ácidos cinámicos, figura 40.



-Figura 40-

3.2 REDUCCIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS; MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ALCOHOLES.

El átomo de carbono del ácido carboxílico se encuentra en su máximo estado de oxidación y es susceptible de reducirse hasta aldehído o alcohol. Debemos considerar tres tipos de reducciones posibles:

- Hidrogenación catalítica.
- Reducciones con hidruros de complejos metálicos.
- Reducciones con diborano.

3.2.1 Hidrogenación catalítica.

Por regla general, el grupo carbonilo no adiciona hidrógeno tan rápidamente como lo hacen los dobles y triples enlaces, por tanto, se pueden reducir fácilmente alquenos o alquinos en presencia de grupos carboxílicos en la misma molécula. Empleando paladio como catalizador y aumentando la presión y temperatura, es posible reducir aldehídos y cetonas hasta alcoholes, pero los ácidos carboxílicos, ésteres y amidas son comparativamente inertes.

3.2.2 Reducciones con hidruros de complejos metálicos.

Los ácidos carboxílicos se reducen rápidamente hasta alcoholes por tratamiento con hidruros metálicos como el hidruro de aluminio y litio (LAH). En general el hidruro de aluminio y litio reduce cualquier derivado de ácido carboxílico hasta su primer estado de oxidación. El ácido inicial adiciona una molécula de hidruro produciéndose un intermedio tetraédrico con un enlace polar oxígeno-aluminio, el intermedio evoluciona eliminando un alcóxido de aluminio y formando un aldehído que rápidamente adiciona de nuevo hidruro transformándose en el alcohol, un tercio del hidruro inicial se pierde en forma de hidrógeno

El borohidruro sódico no es capaz de reducir ácidos carboxílicos para obtener alcoholes, forma carboxilatos. Se suele emplear en reducciones de aldehídos y cetonas en disolventes polares, siendo escasamente soluble en disolventes apolares.

Existen escasos métodos de reducción de ácidos hasta aldehídos, la unión de grupos alquil o alcóxido al átomo de aluminio (LtBAH, DIBAH, por

ejemplo), modifica la reactividad y solubilidad del LAH y siendo un método eficaz para la obtención de aldehídos. En caso de exceso de reductor o la temperatura por encima de 0°C se obtienen los alcoholes.

3.2.3 Reducciones con diborano.

El diborano se disocia en trihidruro de boro y reduce de forma eficaz ácidos carboxílicos y derivados, siendo uno de los mejores métodos de obtención de alcoholes.

En la siguiente tabla se muestra un resumen de los procedimientos de obtención de alcoholes empleando estos reductores.

Reactivo	Aldehídos y cetonas	Ácidos Carboxílicos	Ésteres	Cloruros de Ácido
H ₂ /Cat.	Alcohol (Lenta)	(muy lenta)	(muy lenta)	Aldehído
NaBH ₄	Alcohol	no reacciona	Alcohol (Lenta)	mezclas
LiAlH ₄	Alcohol	Alcohol	Alcohol	Alcohol
LiAlH(Ot-Bu) ₃	Alcohol (Lenta)	no reacciona	(muy lenta)	Aldehído (-78°C)
(iso-Bu) ₂ AlH	Alcohol	Alcohol	Aldehído (-78°C)	Alcohol
B ₂ H ₆	Alcohol (Lenta)	Alcohol	(muy lenta)	mezclas

-Tabla 7-

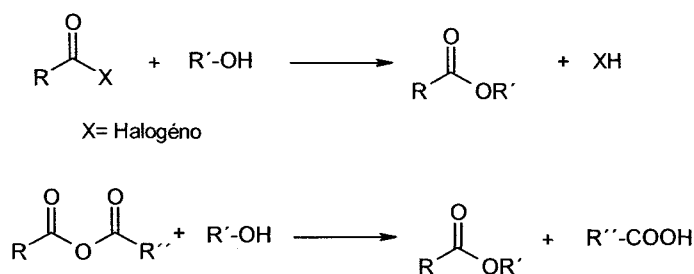
3.3 MÉTODOS GENERALES DE FORMACIÓN DE ÉSTERES.

La acilación es una de las técnicas de transformación más versátiles en química y se han desarrollado numerosos métodos y técnicas para la acilación de una gran variedad de sustratos. El agente acilante ideal sería ácido graso como tal, pero su reactividad frente nucleófilos es limitada. Una solución suele ser la transformación en algún derivado mucho más reactivo como cloruros o bromuros de ácido o anhídridos y posterior desplazamiento nucleofílico (March, 1992).

3.3.1 Alcoholisis de haluros y anhídridos de ácido.

La reacción entre haluros de acilo y alcoholes o fenoles (acilación) es, en general, el mejor método para la formación de ésteres carboxílicos. La reacción es aplicable a numerosos reactivos con distintos grupos funcionales. Frecuentemente se usa piridina para neutralizar el ácido que se forma, aunque admite otras bases. R Y R' pueden ser restos alquilo o arilo primarios, secundarios, o terciarios. En el caso de ácidos impedidos o alcoholes terciarios, puede emplearse el alcóxido en lugar del alcohol. Para fenoles impedidos se ha suele emplear junto con catálisis de transferencia de fase (March, 1992; Kurt et al, 1948) .

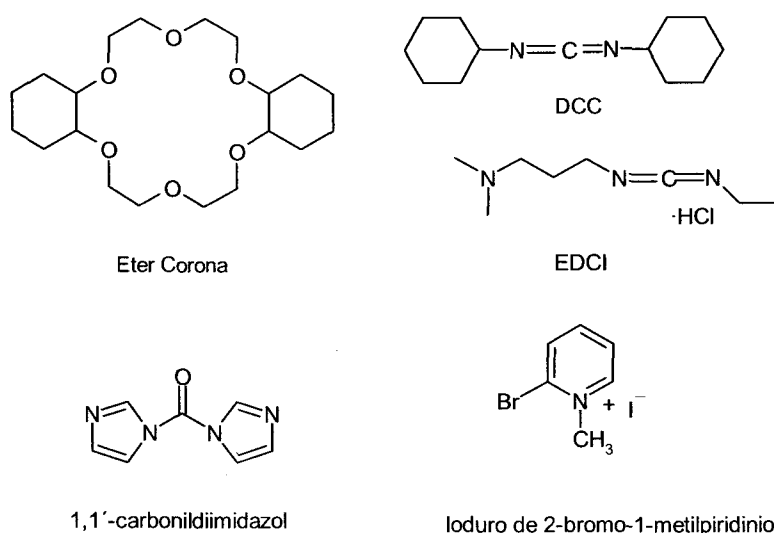
La alcoholisis de anhídridos se emplea para la formación de ésteres con la misma frecuencia que la acilación, aunque los anhídridos son generalmente menos reactivos (figura 41). Se suele emplear medio básico, generalmente piridina y dimetilamino piridina (DMAP) como catalizador (Haslam et al, 1980; March, 1992).



-Figura 41-

3.3.2 Reactivos y técnicas especiales de acilación.

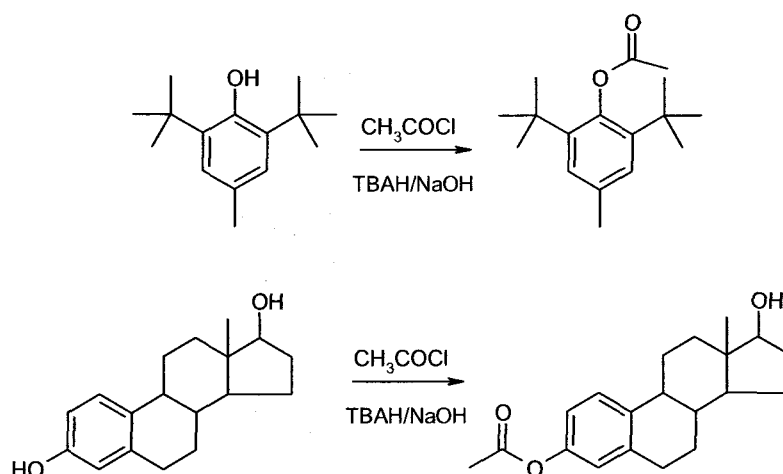
Se han desarrollado técnicas de acilación para sustratos problemáticos, como pueden ser alcoholes impedidos, o moléculas sensibles al pH que transcurren en condiciones más suaves de reacción. El empleo de catálisis de transferencia de fase asistida por éteres corona o la activación electrofílica con carbodiimidas, 1,1'-carbonildiimidazol, o ioduro de 2-bromo-1-metilpiridinio son algunas de las técnicas más empleadas (figura 42) (Haslam 1979; March, 1992).



-Figura 42-

3.3.2.1 Catálisis de transferencia de fase.

En contraste con la cantidad de procedimientos de alquilación que emplean catálisis de transferencia de fase, existen pocas referencias sobre acilaciones con este tipo de catálisis, pero resulta de gran utilidad sobre todo con sustratos voluminosos. El empleo de haluros de acilo es incompatible con la presencia de una fase orgánica y una acuosa, por tanto se requiere el empleo de un sistema bifásico sólido/líquido constituido por un hidróxido, y el disolvente orgánico adecuado (diclorometano, éter, THF) junto con una sal de amonio cuaternaria que constituye el catalizador de transferencia de fase. Este tipo de metodología ha resultado efectiva para la esterificación de fenoles impedidos como el 2,6-di-t-butil-p-cresol (figura 43) (Illi et al, 1979).

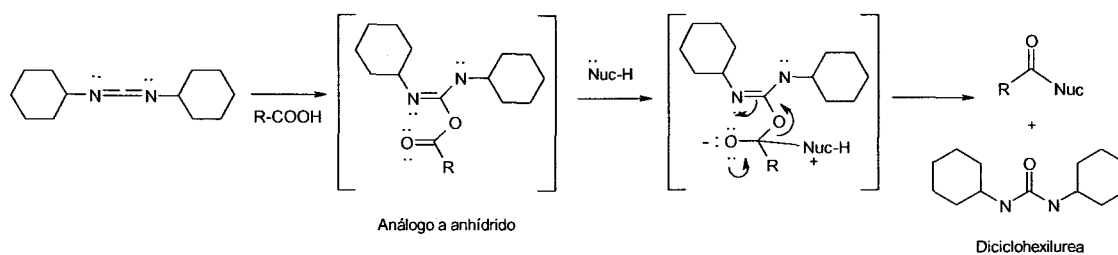


-Figura 43-

3.3.2.2 Activación electrofílica.

- Carbodiimidas

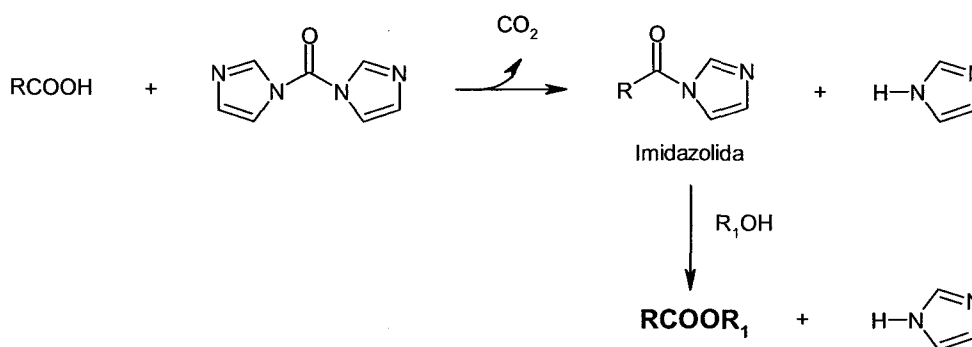
Un procedimiento alternativo de esterificación menos drástico que la conversión a cloruro o anhídrido de ácido, es el empleo de algún reactivo que active al ácido frente la sustitución nucleofílica. Este es el caso por ejemplo del empleo de dicitohexilcarbodiimida (DCC) / 4-dimetilamino piridina (DMAP) que ha demostrado ser un método conveniente para la esterificación de ácidos grasos con alcoholes y tioles, en condiciones muy suaves de reacción (Steglich et al, 1978; Sturino et al, 1998). La esterificación se produce en medio neutro o ligeramente básico por la activación electrofílica del ácido sin necesidad de recurrir a la formación cloruros o anhídridos de ácido. Como disolventes se pueden emplear diclorometano u otros disolventes apróticos, de polaridades similares, como el éter, el tetrahidrofurano o el acetonitrilo. La reacción es aplicable a una amplia variedad de ácidos y alcoholes incluidos polioles e incluso a compuestos sensibles como la vitamina A. El principal inconveniente de la reacción es la formación de N,N-dicitohexilurea (DCU) como subproducto que resulta de difícil eliminación del medio de la reacción, figura 44. Se han desarrollado carbodiimidas, como la 1 etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidroclicórica, (EDCI), que originan N-acilureas solubles en agua que se eliminan fácilmente en el prodesado.



-Figura 44-

-Imidazolidas.

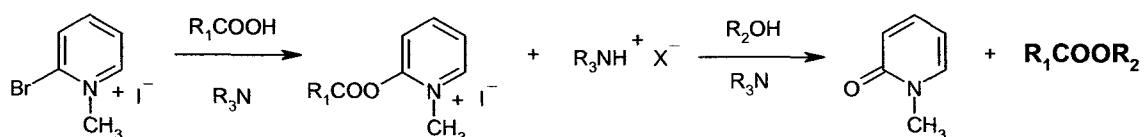
Otra alternativa eficaz consiste en la activación del ácido graso con 1,1'-carbonildiimidazol formándose una imidazolida que reacciona rápidamente con un alcohol en presencia de una base, para originar el correspondiente éster, figura 45, (Christie, 1993).



-Figura 45-

- Ioduro de aciloxipiridinio.

Un último ejemplo de activación de ácidos carboxílicos consiste en la formación del éster en presencia de ioduro de 2-bromo-1-metilpiridinio. La reacción se produce a través de la formación del ioduro de 2-aciloxi-1-metilpiridinio que sufre el ataque nucleofílico del alcohol en presencia de una amina terciaria para eliminar el ioduro de hidrógeno que se produce, figura 46, (Christie, 1993).



-Figura 46-

3.4 BIOCATÁLISIS EN SÍNTESIS QUÍMICA.

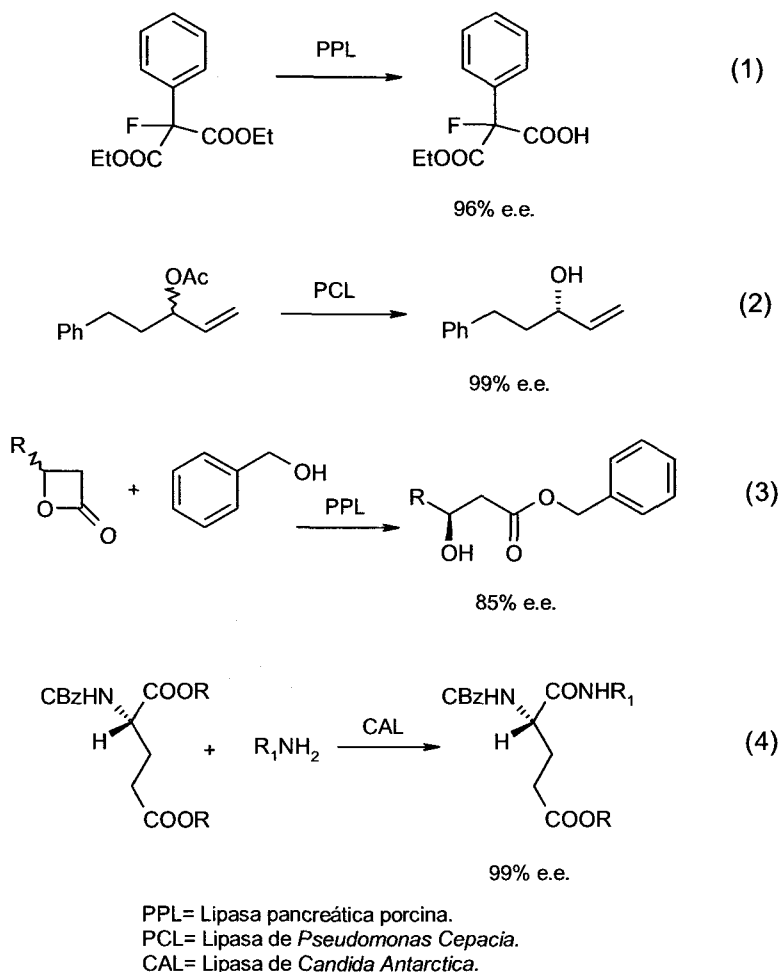
En las últimas décadas, el uso de las biotransformaciones en química orgánica, ha permitido ampliar el número de herramientas de las que disponen los químicos para llegar a síntesis de compuestos enantioméricamente puros (Drauz et al, 1995).

El número de publicaciones referentes al empleo de enzimas es amplísimo, cubriendo además un amplio abanico de biotransformaciones entre las que se encuentran transacilaciones, reducciones, oxidaciones, formación de enlaces carbono-carbono, síntesis de carbohidratos, etc., entre las más notables, figura 47, (Davis et al, 2001). La tabla 8 muestra una clasificación con las principales familias de enzimas.

Familia	Biotransformación
Lipasas	Acil transferasas que catalizan la formación y/o hidrólisis de variados enlaces éster y amida
Esterasas	
Peptidasas	
Acilasas	
Glicosidasas	Síntesis de carbohidratos
Glicosil-transferasas	
Epoxidasas	Enzimas hidrolíticas que catalizan hidrólisis enantioselectivas
Nitrilasas	
Nitrilo-hidratasas	
Aldolasas	Enzimas que catalizan reacciones de formación de enlaces C-C
Oxinitrilasas	
Oxidasas	Hidroxilaciones y dihidroxilaciones
Reductasas	Reducciones de carbonilos y nitrilos

-Tabla 8-

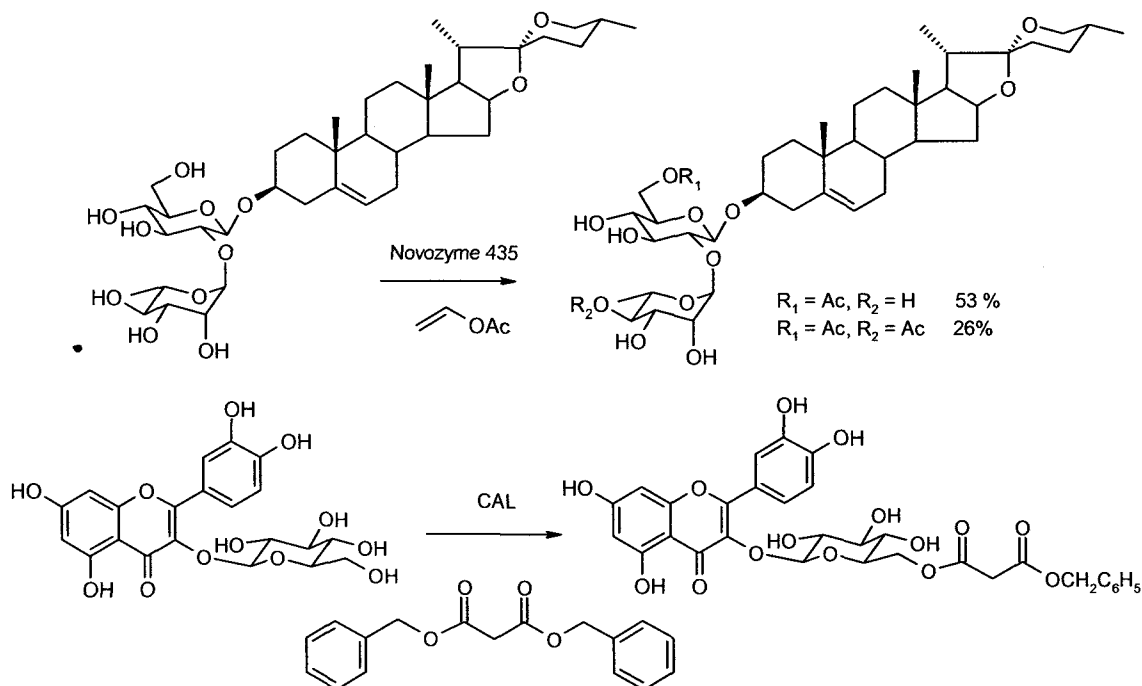
De toda la cantidad de biocatalizadores que existen, las lipasas son las más empleadas. Estas enzimas son capaces de llevar a cabo reacciones de hidrólisis enantioselectivas (figura 48, (1) y (2)) y catalizar la formación de un amplio abanico de enlaces éster y amidas, siendo esta su aplicación más utilizada (figura 48, (3) y (4)).



-Figura 48-

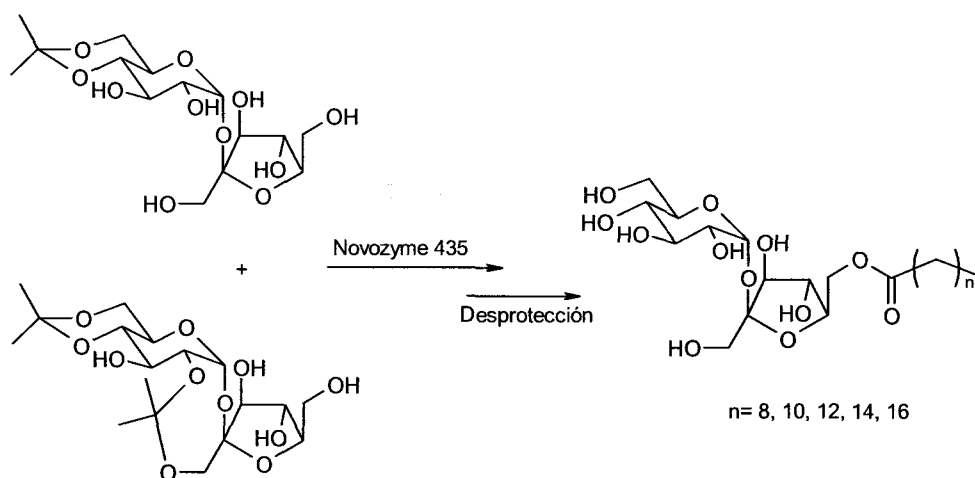
En general las lipasas muestran selectividad preferentemente sobre los hidroxilos primarios (Danieli et al, 1994, Danielli et al, 1995; Barili et al, 1997). De todas las lipasas existentes, la lipasa B de *Candida antarctica* ha resultado ser especialmente eficaz para la diferenciación de hidroxilos primarios en las biotransformaciones realizadas en disolventes orgánicos sobre productos orgánicos polihidroxilados (Danieli et al, 1997). Estudios de acilación de saponinas con ésteres vinílicos como agentes acilantes (Yu et al, 2001), o la introducción de restos de malonato a partir de dibenzil malonato sobre glicósidos flavonoides (Riva et al, 1997) demuestran la compatibilidad de la

reacción con moléculas con restos glicosídicos complejos o grandes agliconas, y dan idea de la variedad de sustratos que es capaz de emplear la enzima en la reacción de transesterificación (Figura 49).



-Figura 49-

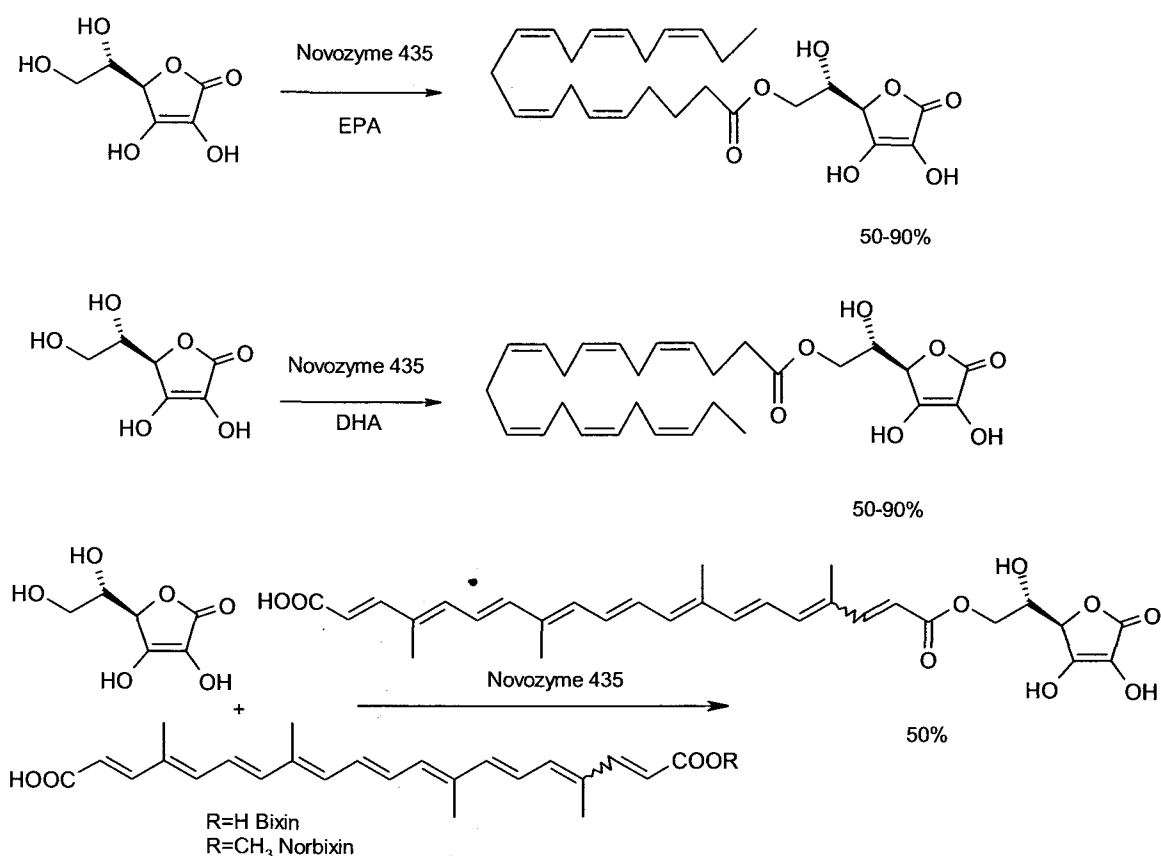
Este tipo de acilaciones también se ha empleado satisfactoriamente para sintetizar ésteres de carbohidratos y ácidos grasos para su uso como surfactantes y emulsionantes en alimentación, detergentes o en la industria cosmética (Vulfson et al, 1999; Vulfson et al, 1996; Linhardt et al, 1997; Humeau et al, 1995), por ejemplo el empleo Vulfson y colaboradores han empleado Novozyme 435 para sintetizar ésteres de sacarosa con ácidos grasos de distinta longitud, a partir de mezclas de acetales de sacarosa (figura 50).



-Figura 50-

Otra de las aplicaciones importantes que tiene el uso de enzimas en síntesis, debido a su selectividad y condiciones suaves de reacción, es la esterificación de moléculas sensibles junto con antioxidantes para producir la estabilización de la molécula lábil. En este sentido, Humeau y colaboradores (Humeau et al, 1998) han sintetizado mediante lipasa de *Cándida Antarctica* ésteres de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) junto con ácido ascórbico como antioxidante. Los resultados indican que la reacción se ha producido sin alteración de los productos con rendimientos entre el 50-90%. Los mismos autores publican en otro artículo la esterificación de los lípidos poliinsaturados bixin y norbixin de la familia de los carotenoides, con ácido ascórbico para su estabilización para su uso como colorante (figura 51) (Humeau et al, 2000).

En la práctica, el manejo de las enzimas y puesta en marcha de las reacciones resulta muy sencillo; Una de las formas más habituales de presentación de las enzimas es inmovilizadas sobre algún tipo de polímero, de esta forma se añade la enzima sobre los reactivos, se cierra el matraz y se agita. El procesado se realiza por filtración, regenerándose en muchos casos la enzima para posteriores usos, los productos quedan en disolución prácticamente sin ningún tratamiento adicional posterior, salvo la purificación.



-Figura 51-

Cuando la estereoselectividad de una reacción enzimática o su rendimiento no son satisfactorios, se suelen variar distintos parámetros experimentales.

Naturaleza del disolvente:

Es conveniente probar la reacción en distintos tipos de disolventes, como terc-butilmetil éter, hexano, tolueno, acetonitrilo, a fin de evaluar en que tipo de disolvente se consigue mejor conversión.

Contenido en agua de los solventes.

Siempre y cuando sea posible, puede ser conveniente añadir pequeñas cantidades de agua a los disolventes que se emplean en la síntesis. Las reacciones sobre alcoholes empleados directamente como disolventes, deben de estar completamente secos.

Naturaleza del acilante.

Se pueden sustituir el agente acilante para ver como influye en la reacción, por ejemplo acetatos por butiratos o lauratos, esteres vinílicos por esteres de isoprenilo etc.

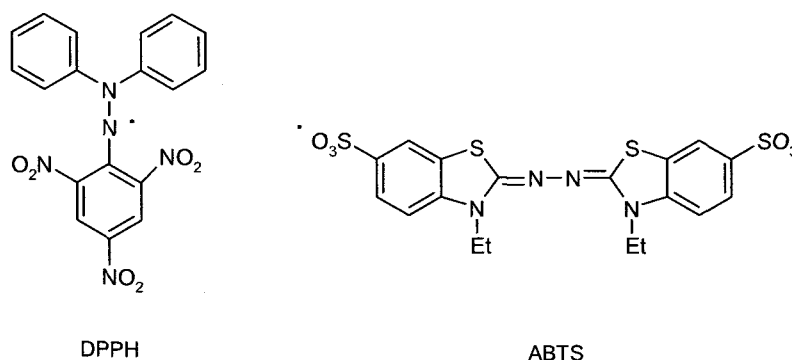
Temperatura.

El rango de temperatura en el cual trabajan las enzimas comprende de 5 a 40 °C, aumentos de temperatura por encima de estos valores pueden originar aumento en la velocidad de reacción, pero pérdida de estereoselectividad. Temperaturas por encima de 50 °C pueden desnaturalizar el enzima.

3.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CAPTACIÓN DE RADICALES LIBRES MEDIANTE RADICALES CROMOGENICOS.

El principal mecanismo de actuación de los antioxidantes fenólicos es mediante la captación de radicales libres, aunque pueden estar involucrados además otros mecanismos menos relevantes (como la capacidad complejante por ejemplo). Es necesario disponer de métodos sencillos, robustos y fiables para la determinación de la capacidad de captación de radicales libres, independientemente del tipo de muestra (Frenkel et al, 1998).

Los dos compuestos cromogénicos más utilizados por su facilidad, rapidez y sensibilidad, para determinar la actividad de antioxidantes de moléculas orgánicas son los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}, figura 52.



-Figura 52-

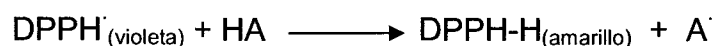
Ambos radicales, presentan excelente estabilidad en las condiciones determinadas para el ensayo, aunque hay que hacer alguna referencia en cuanto a su preparación y manejo (Arnao, 2000).

- El radical DPPH[•] se utiliza por disolución directa, mientras el radical ABTS^{•+} es necesario generarlo previamente química (dioxido de manganeso, persulfato potásico) o enzimáticamente (peroxidasas), (Blois, 1958; Arnao et al, 1999; Miller et al, 1997;).
- El radical ABTS^{•+} puede solubilizarse tanto en medio acuoso como en disolventes orgánicos lo que permite la determinación de la actividad antioxidante tanto de molécula hidrofílicas como lipofílicas mientras que radical DPPH[•] solo es aplicable en medios orgánicos alcohólicos (Cano et al, 2000; Arnao et al, 2001).

En cualquier caso, el método de medida de la capacidad antioxidante de cualquier molécula consiste en: disolver el radical cromogénico en el medio adecuado, añadir el antioxidante y medir la disminución que se produce en la absorbancia de la muestra durante un periodo concreto de tiempo. Finalmente la disminución de absorbancia puede correlacionarse en una curva dosis-respuesta junto con antioxidantes control como el trolox o el ácido ascórbico, expresando la actividad antioxidante en forma de equivalentes de los antioxidantes control (Capacidad Antioxidante en Equivalente Trolox TEAC, o VCEAC) (Pellegrini et al, 1999; Lee et al, 2002).

3.5.1 Determinación de la capacidad de captación de radicales libres (RSA) mediante DPPH.

El método se basa en la disminución de la absorbancia producida a 515 nm en una disolución del radical en presencia de compuestos fenólicos, de acuerdo con la siguiente reacción:



La disminución que experimenta la absorbancia de la disolución de DPPH cuando se le añade el antioxidante se expresa en % y se denomina porcentaje de inhibición.

$$\% \text{ Inhibición} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

Donde A_{control} y A_{muestra} son las absorbancias del control y de la muestra respectivamente.

Este radical ha sido utilizado durante décadas para medir actividad antioxidante de compuestos con grupos SH, OH y NH, entre las cualidades principales que presenta destaca su estable absorbancia en un amplio rango de pH.

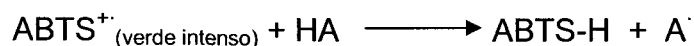
Los procedimientos analíticos del método encontrados en la literatura, difieren unos de otros en bastantes factores experimentales; (relación antioxidante/ radical, tiempo de reacción, solvente, etc.). Los resultados del orden de reactividad y magnitud antioxidante muchas veces difieren de un

artículo publicado a otro. Tsimidou y colaboradores escriben, distintas recomendaciones para realizar estudios antioxidantes. Entre las recomendaciones que dan para la estandarización del método analítico está la realización de la reacción de inhibición a 20 minutos y con una relación molar entre antioxidante/ DPPH que proporcione una inhibición en la producción de radicales libres radicales entre el 60-80% en 10 minutos de reacción para el antioxidante más potente (Tsimidou et al, 2002).

La evaluación de la actividad antioxidante se suele expresar también mediante el parámetro EC_{50} , que se define como la cantidad de antioxidante necesaria para reducir a la mitad la concentración inicial del radical. Por tanto, menor valor de EC_{50} , se corresponde con mayor capacidad antioxidante.

3.5.2 Determinación de la capacidad de captación de radicales libres mediante ABTS.

El método del catión radical $ABTS^+$ ha sido utilizado para la evaluación de la actividad antioxidante de sustancias lipofílicas como los carotenos. El radical generado presenta máximos de absorción en la zona próxima al IR cercano (630,734 y 812 nm). El fundamento de actuación es similar al del radical DPPH, produciéndose una disminución en la coloración de la disolución al adicionar el antioxidante.



$$\% \text{ Inhibición} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

Donde A_{control} y A_{muestra} son las absorbancias del control y de la muestra respectivamente.

3.6 DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A LA OXIDACIÓN EN LOS ALIMENTOS.

Al comienzo de la oxidación, la velocidad de la reacción es baja y prácticamente cualquier radical libre que se produce es inactivado por los antioxidantes. Esta primera etapa se conoce con el nombre de periodo de inducción. Cuando se consumen los antioxidantes del medio, los radicales libres permanecen e inician la oxidación en cadena, lo que se traduce en un incremento considerable de la velocidad de la reacción.

El aumento relativo del periodo de inducción debido a la adición de antioxidantes se conoce con el nombre de factor de protección. Los factores de protección son generalmente altos en sustratos lipídicos con baja insaturación, que carecen de cantidades importantes de antioxidantes naturales, como la manteca de cerdo (del orden de 20 a 70). En cambio, los factores de protección de aceites comestibles, con elevado contenido de antioxidantes naturales, suelen ser bajos (entre 2 y 4).

Para evaluar la resistencia a la oxidación debemos utilizar métodos acelerados, que nos permitan obtener resultados rápidamente y que reproduzcan con la mayor fidelidad posible el proceso oxidativo. Estos métodos acelerados generalmente emplean altas temperaturas o catálisis para inducir la oxidación.

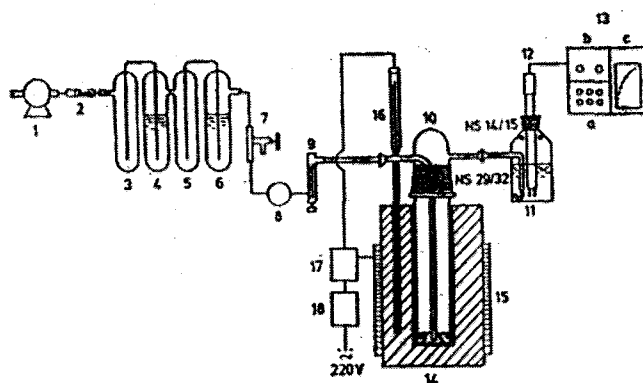
El periodo de inducción se determina de distintas maneras, como por ejemplo mediante el índice de peróxidos, la formación de dienos conjugados, el índice de p-anisidina, variaciones en la conductividad o la presión (Pokorný, 1999).

Entre los métodos para evaluar la resistencia a la oxidación, se encuentran el horno de Schaal, donde las muestras se introducen en una cámara calefactora y se calientan a 40° o 60° (o temperaturas mayores) con acceso libre al oxígeno y se analizan después de varios días de almacenamiento.

El método más conocido, y ampliamente utilizado como método de referencia, es el denominado método del oxígeno activo (AOM) o procedimiento de Swift, donde las muestras se calientan a 100° o 110° en un baño termostático y con corriente de aire. Periódicamente se extrae grasa y se

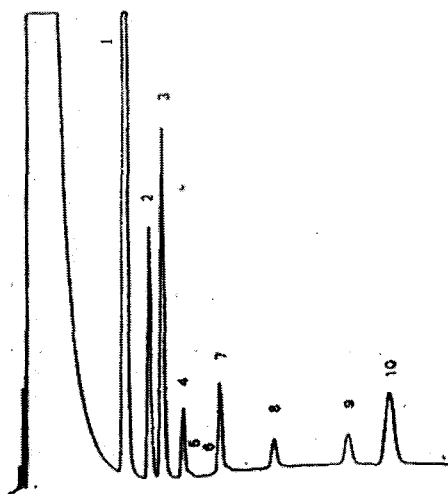
determina el índice de peróxidos (IP). El punto final es el tiempo necesario para llegar a 100 meq/Kg de IP, obtenido por interpolación. Inconvenientes de este método son: que requiere mucha dedicación del personal de laboratorio, alto consumo de reactivos y origina determinaciones excesivamente largas.

Una modificación a este procedimiento la constituye el método del Rancimat, donde los gases desprendidos durante el calentamiento, se recogen sobre una trampa de agua y se mide la conductividad de la celda, realizándose la determinación de manera automática, figura 53.

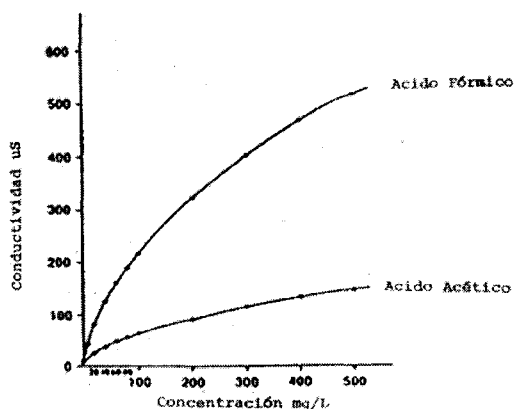


-Figura 53-

El aumento de la conductividad se debe a la presencia de pequeños ácidos grasos, especialmente ácido fórmico, originados por reacciones secundarias en las últimas etapas de la oxidación. Además de ácido fórmico, también se forman los ácidos acético, propiónico, butírico, valérico y caprónico; según se desprende de la figura 54, las concentraciones de ácido fórmico son más altas que las de los demás ácidos, por otro lado, a igual concentración, el ácido fórmico genera mayor conductividad que otros ácidos.

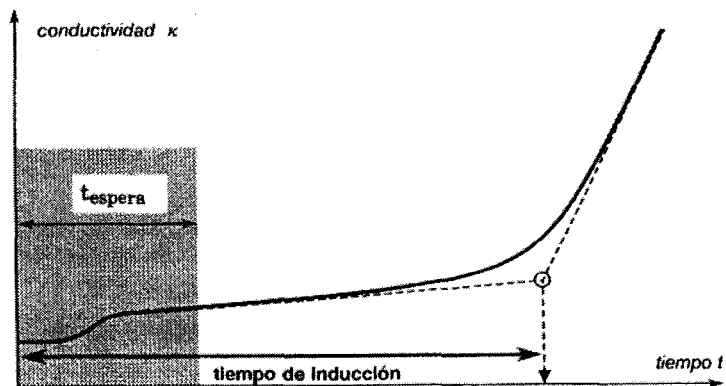


(1 Ácido Fórmico, 2 Ácido Acético, 3 butanol, 4 ácido propiónico, 7 butírico, 8 valerianico, 9 caproico).



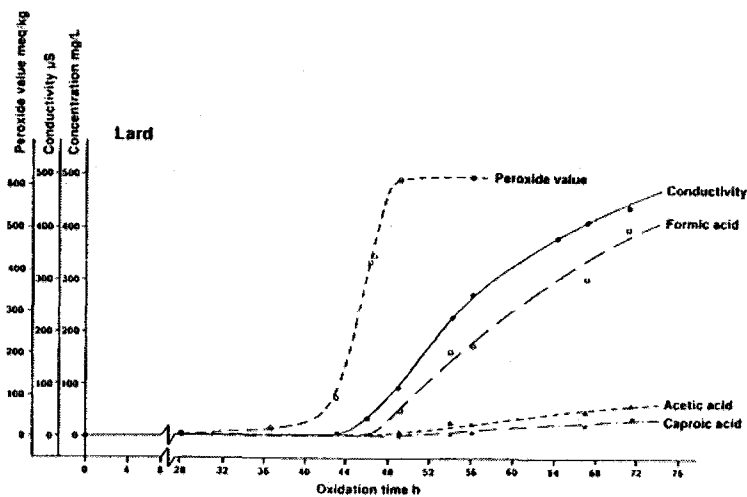
-Figura 54-

El periodo de inducción se determina en el punto de inflexión de la gráfica de la conductividad en función del tiempo con el punto de corte de las pendientes de ambos tramos de la curva, figura 55.

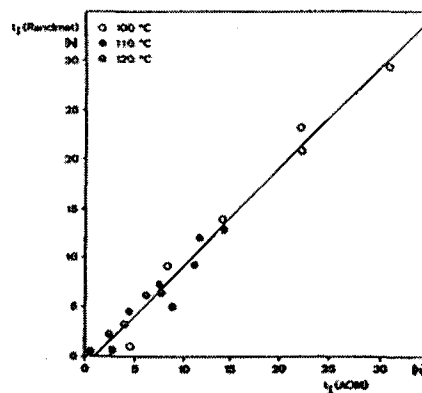


-Figura 55-

El método del Rancimat es de los más utilizados debido a su facilidad, rapidez y reproducibilidad en los datos. Rancimat y AOM siguen un proceso idéntico de degradación de las muestras y difieren en la determinación del punto final. Si bien el índice de peróxidos 100 se obtiene tras la inflexión de la curva de oxidación, la generación de compuestos volátiles es posterior al crecimiento del índice de peróxidos, como se observa en la figura 56, a pesar de esto, los resultados son comparables y se obtienen buenas correlaciones lineales entre los resultados que se obtienen por ambos métodos, figura 57.



-Figura 56-



-Figura 57-

Existen otros métodos que se realizan a temperatura ambiente y donde se registran las variaciones de presión que se producen durante la oxidación de las muestras con presión alta de oxígeno y sin aireación. Este procedimiento

reproduce con precisión, los cambios originados en los productos durante los periodos de almacenamiento.

Los métodos que aceleran la oxidación empleando sustancias fotosensibles o catálisis con metales pueden mostrar discrepancias con los resultados que finalmente se obtienen en la práctica.

Se han desarrollado distintos métodos instrumentales, como por ejemplo el análisis mediante cromatografía de gases de los compuestos volátiles que originan olores desagradables durante la oxidación (pentano, hexanal o 2,4-decadienal por ejemplo), o métodos por HPLC para medir la presencia de compuestos oxidados.

3.7 MÉTODOS COMPUTACIONALES DE CÁLCULO EMPLEADOS EN QUÍMICA ORGÁNICA.

El desarrollo de los ordenadores ha traído consigo avances verdaderamente notables en la capacidad de los químicos cuánticos para abordar problemas de interés químico real. Los cálculos mecanocuánticos que generalmente se limitaban a pequeñas moléculas, se aplican ahora a moléculas de tamaño medio e incluso notablemente grande y en múltiples campos de aplicación (catálisis, interacciones enzima-sustrato, mecanismo de reacción, etc.).

Vamos a ver de forma resumida cómo se pueden calcular propiedades moleculares a partir de funciones de onda electrónicas aproximadas y los avances más importantes realizados en los últimos años en el cálculo de la estructura electrónica molecular.

3.7.1 Antecedentes históricos.

En 1926, Erwin Schrödinger formuló la ecuación que lleva su nombre. En su primera publicación sobre mecánica cuántica, resolvió la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo para el átomo de hidrógeno, obteniendo niveles de energía en concordancia con el espectro observado.

Todas las propiedades moleculares son, en principio, calculables mediante la solución de la ecuación de Schrödinger para la molécula. Debido a las grandes dificultades matemáticas para resolver la ecuación de Schrödinger molecular en átomos y moléculas polielectrónicas, se deben hacer aproximaciones. A partir de 1960 el uso de ordenadores ha hecho que los cálculos de funciones de onda moleculares sean lo suficientemente precisos para dar información cuantitativa fiable en muchos casos.

La mejor función de onda posible con electrones asignados a los orbitales es la función de onda de Hartree-Fock. Entre 1927 y 1930, el físico inglés Hartree y el ruso Fock desarrollaron un método sistemático para encontrar las mejores formas posibles para los orbitales considerando que los orbitales pueden ser de cualquier forma y no solo orbitales hidrogenoides. Una función de onda variacional que sea un producto antisimetrizado de orbitales óptimos se llama función de onda de Hartree-Fock. Para cada estado de un

sistema dado, hay una función de onda de Hartree-Fock única. Hartree y Fock demostraron que los orbitales ϕ_i de Hartree-Fock satisfacían la ecuación (1). La función de onda Hartree-Fock es la función de onda más aceptable, la de menor energía, que asigna cada electrón a un determinado espín-orbital.

Para resolver la ecuación (1) para los orbitales Hartree-Fock de un átomo o molécula con muchos electrones se precisa un tremendo esfuerzo de cálculo y no fueron factibles, como hemos indicado, hasta la aparición de ordenadores de alta velocidad en la década de los 60.

Los orbitales de Hartree-Fock ϕ_i de una molécula se hallan mediante la solución de las ecuaciones de Hartree-Fock (1) donde F es un operador matemático muy complicado denominado operador Hartree-Fock. Cada orbital ϕ_i es una función de las tres coordenadas espaciales y ε_i es la energía del orbital i . Cada orbital molecular de Hartree-Fock se expresa como una combinación lineal de funciones llamadas funciones base. Si se incluyen suficientes funciones base, se pueden obtener orbitales moleculares que prácticamente no difieren de los orbitales moleculares de Hartree-Fock verdaderos. Pueden utilizarse cualquier tipo de funciones como funciones base, como las moléculas están compuestas por átomos enlazados, es más conveniente el utilizar orbitales atómicos como funciones base. Cada orbital molecular se escribe, pues, como una combinación lineal del conjunto de orbitales atómicos base, y los coeficientes de cada orbital atómico se calculan resolviendo las ecuaciones de Hartree-Fock.

Para tener una representación precisa de un orbital molecular se requiere que el orbital molecular se exprese como una combinación lineal de un conjunto completo de funciones. Esto quiere decir que todos los orbitales atómicos, tanto ocupados o no en el átomo libre, contribuyen a los orbitales moleculares. Para simplificar los cálculos, frecuentemente se resuelven las ecuaciones de Hartree-Fock usando como base sólo aquellos orbitales atómicos de cada átomo cuyo número cuántico principal no excede del número cuántico principal de los electrones de valencia del átomo. Esta base limitada a orbitales atómicos de las capas internas y de valencia se llama base mínima. El uso de una base mínima da sólo una aproximación a los orbitales moleculares de Hartree-Fock. Toda función de onda hallada mediante la solución de las

ecuaciones de Hartree-Fock se llama función de onda de campo autoconsciente (SCF). Una función de onda SCF es precisamente igual a una función de onda de Hartree-Fock sólo si la base es muy grande. Sin embargo, los electrones no están realmente unidos dentro de una distribución estática de carga, sino que interactúan uno con otro instantáneamente. Una función de onda orbital no puede tener en cuenta estas interacciones instantáneas, por lo que la verdadera función de onda no puede expresarse como un producto antisimetrizado de orbitales. El error en la energía dada por la función de onda de Hartree-Fock se llama energía de correlación, puesto que resulta del hecho de que la función de onda de Hartree-Fock no tiene en cuenta las correlaciones instantáneas en el movimiento de los electrones. Los electrones se repelen mutuamente y correlacionan sus movimientos para evitar estar próximos. Un método a menudo utilizado para mejorar una función de onda Hartree-Fock es la interacción de configuración (CI). En un cálculo de interacción de configuraciones, la función de onda se expresa como una combinación lineal de funciones Hartree-Fock y funciones donde algunos de los electrones ocupan orbitales excitados. Los cálculos CI por ordenador son extremadamente largos, puesto que requieren a menudo combinaciones lineales de miles de funciones de estado de configuración para obtener una representación precisa de la función de onda.

3.7.2 Cálculo de propiedades moleculares a partir de funciones de onda aproximadas.

Sin entrar en el tratamiento matemático de los problemas que se plantean, vamos a ver algunas de las propiedades moleculares que se obtienen a partir de las funciones de onda aproximadas, y cual es en cada caso la mejor aproximación para su resolución.

3.7.2.1 Geometría molecular.

La geometría de equilibrio de una molécula es la configuración espacial de los núcleos para la cual la energía es mínima. Para determinar la geometría de equilibrio teóricamente, se calcula la función de onda molecular y la energía electrónica para muchas configuraciones nucleares diferentes, variando las distancias, ángulos de enlace y ángulos diedros para hallar la configuración de

energía mínima. Una manera muy eficaz de encontrar la geometría de equilibrio incluye el cálculo de las derivadas de la energía electrónica con respecto a cada una de las coordenadas nucleares para una geometría supuesta inicialmente, este conjunto de derivadas se denomina gradiente de energía. Los valores de estas derivadas se usan entonces para cambiar las coordenadas nucleares a valores nuevos que se suponen más cercanos a la geometría de equilibrio, y se calcula la función de onda, energía y gradiente para la nueva geometría. Este proceso se repite hasta que los componentes del gradiente de energía son todos aproximadamente cero, lo que indica que se ha alcanzado el mínimo de energía.

Aunque la función de onda del orbital molecular Hartree-Fock difiere significativamente de la función de onda verdadera, generalmente da valores precisos para las distancias y ángulos de enlace. En la tabla se muestran algunos ejemplos de geometrías calculadas por Hartree-Fock, entre paréntesis se encuentran los valores experimentales.

Se ha comprobado que para obtener una geometría exacta solamente se necesita una aproximación a la función Hartree-Fock. Las funciones de base SCF generalmente dan una geometría exacta, pero en algunas ocasiones conducen a errores grandes. En general se utiliza en un cálculo SCF una base algo mayor que la mínima para obtener una geometría veraz.

3.7.2.2 Momentos dipolares.

Se encuentra que las funciones de onda de orbitales moleculares Hartree-Fock dan generalmente valores precisos de los momentos dipolares moleculares.

En la tabla se muestran algunos valores teóricos de momento dipolar comparados con valores experimentales.

El valor del momento dipolar del CO calculado según Hartree-Fock está en la dirección errónea. El cálculo usando una función de onda CI da la polaridad correcta para el CO.

Las funciones de base SCF, solamente dan valores bastante precisos para momentos dipolares y se necesita una base mayor que la mínima para obtener una buena precisión.

3.7.2.3 Energías de ionización.

La energía de ionización molecular I es la energía que se necesita para arrancar el electrón menos sujeto de la molécula. Koopmans demostró en 1933 que la energía necesaria para arrancar un electrón de un orbital de un átomo o molécula con una capa llena es aproximadamente la energía orbital de Hartree-Fock ϵ_i cambiada de signo. Por tanto, la energía de ionización molecular puede estimarse calculando $-\epsilon_i$ del orbital molecular ocupado más alto. Los valores de potenciales de ionización encuentran bastante acuerdo con los datos experimentales como se puede observar en la tabla ().

3.7.2.4 Energías de disociación.

Para calcular la energía de disociación teórica se resta la energía molecular en la geometría de equilibrio calculada según Hartree-Fock de las energías de los átomos que forman la molécula separada.

Las funciones de onda Hartree-Fock dan valores de energía de disociación pobres, algunos resultados se muestran en la tabla ().

Las funciones de onda Hartree-Fock predicen que los átomos separados de fluor, por ejemplo, son más estables que la molécula de fluor.

3.7.2.5 Barreras rotacionales.

Para calcular teóricamente la barrera rotacional, se calculan las funciones de onda y energías para las geometrías alternada y eclipsada, y se toma la diferencia. Las funciones de onda dan valores bastante precisos de las barreras rotacionales siempre que se use una base considerablemente mayor que la mínima. Algunos resultados son: (tabla).

La razón de que el método de Hartree-Fock funcione bien en los cálculos de barreras es que al pasar de la conformación alternada a la eclipsada no se rompen ni se forman enlaces, y la energía de correlación (que es el error de energía en el método de Hartree-Fock) es prácticamente el mismo en las dos conformaciones. Por el contrario, cuando una molécula se disocia, se rompen uno o más enlaces y la energía de correlación cambia sustancialmente. La función de onda Hartree-Fock es, por tanto, inadecuada para el estudio de la

disociación. Para calcular energías de disociación se necesitan funciones de onda de interacción de configuraciones, CI.

3.7.2.6 Energía relativa de isómeros.

Aunque las energías de disociación de moléculas en átomos calculadas por el método Hartree-Fock presentan un error considerable, se ha encontrado que las energías relativas de moléculas isómeras pueden predecirse con bastante exactitud mediante las funciones de onda Hartree-Fock. Las energías relativas de los isómeros se calculan por el mismo procedimiento que las barreras rotacionales debiendo usarse una base considerablemente mayor que la mínima para obtener buenos resultados.

Los cálculos SCF con una base mayor que la mínima se han aplicado en la geometría y energía de los intermedios de una reacción que a menudo tienen una vida demasiado corta para que sus estructuras puedan ser determinadas espectroscópicamente.

3.7.3 Cálculo preciso de funciones de onda electrónicas y propiedades moleculares.

Las mayores fuentes de error en los cálculos mecano-cuánticos de las propiedades moleculares son:

- Funciones de base inadecuadas.
- Desprecio o tratamiento incompleto de la correlación electrónica.
- Desprecio de efectos relativistas.

3.7.3.1 Bases.

La mayoría de los cálculos mecano-cuánticos utilizan una base para expresar un orbital molecular. Los cálculos SCF que utilizan una base mínima (que contiene únicamente orbitales atómicos internos y de capa de valencia) no son fiables para obtener propiedades moleculares precisas. Cálculos usando bases muy amplias necesarias para aproximarse a la función de onda de Hartree-Fock son factibles únicamente para moléculas pequeñas. Para moléculas de tamaño medio, se debe limitar el tamaño de la base, y ésta es la principal fuente de error en las propiedades calculadas.

La mayoría de los cálculos moleculares mecano-cuánticos utilizan funciones gaussianas como bases en lugar de orbitales tipo Slater (STO), que producen integrales que necesitan mucho tiempo para ser evaluadas. Las integrales moleculares con funciones base gaussianas se evalúan rápidamente en un ordenador, sin embargo, la función gaussiana no representa de forma tan precisa a como lo hace un orbital STO el comportamiento de un orbital atómico, por tanto se debe utilizar una combinación lineal de unas pocas funciones gaussianas para representar un orbital atómico.

Se ha ideado varias bases gaussianas para su utilización en cálculos moleculares. Algunas de las bases más utilizadas son las contenidas en el programa de estructura electrónica molecular GAUSSIAN. Estas bases, listadas en orden de tamaño creciente, incluyen los conjuntos STO-3G, 3-21G, 3-21G*, 6-31G* y 6-31G**, en las que el número se refiere al número de funciones base para cada átomo.

3.7.3.2 Correlación electrónica.

Para calcular las propiedades moleculares con gran precisión, se debe ir generalmente más allá del método Hartree-Fock (SCF) e incluir la correlación electrónica.

La experiencia muestra que los cálculos CI con bases pequeñas no dan resultados muy precisos para las propiedades moleculares, y que deben emplearse bases al menos tan amplias como 6-31G* en los cálculos CI.

Los químicos cuánticos han desarrollado otros métodos para incluir la correlación electrónica. Uno de estos métodos es la teoría de perturbaciones de Moller-Plesset (MP). La teoría de perturbaciones MP escribe el hamiltoniano molecular electrónico como suma de un hamiltoniano no perturbado y una perturbación que incluye la correlación. La inclusión de hamiltonianos perturbados da lugar a los distintos cálculos MP que se designan como MP2, MP3 y MP4, según el orden de correlación energética que se incluya.

Los cálculos MP2 pueden realizarse mucho más rápidamente que los cálculos CI y actualmente es la forma más habitual de incluir la correlación en cálculos relativos a moléculas en estado fundamental.

3.7.3.3 La teoría funcional de densidad, (DFT).

Un método bastante diferente de los métodos SCF, CI y MP es el método funcional de densidad. Los cálculos DFT no intentan resolver la ecuación de Schrödinger para la función de onda electrónica molecular, se basa en un teorema según el cual, la energía y todas las demás propiedades electrónicas de una molécula están determinadas únicamente por la densidad de probabilidad electrónica, $\rho(x, y, z)$.

Existen distintas aproximaciones en la teoría que dan lugar a los distintos tipos de cálculo, pero que debido a la complejidad del tratamiento, solamente nos vamos a limitar a mencionar los tipos de cálculos que se originan y las ventajas respecto a los anteriores métodos. Los cálculos que se emplean siguiendo la teoría funcional de densidad son: aproximación de densidad local de spin, LSDA, aproximación LSDA-GC, donde GC significa gradiente corregido y la aproximación B-LYP, que debe su nombre a los autores Becke por un lado y a Lee, Yang y Parr por otro.

La experiencia muestra que para alcanzar el nivel de precisión usando cálculos MP y CI se necesitan varios órdenes de magnitud más de tiempo de computación que con cálculos DFT.

Sin embargo, el método DFT no es siempre mejor que los cálculos SCF, por ejemplo en algunos cálculos de energías relativas de isómeros, los cálculos DFT B-LYP son menos precisos que los cálculos SCF. Los cálculos DFT necesitan cantidades de tiempo similares a los cálculos SCF pero generalmente dan resultados más precisos.

3.7.4 Cálculos *ab initio* y semiempíricos.

Los métodos mecano-cuánticos de tratamiento de las moléculas se clasifican en *ab initio* y semiempíricos. Un cálculo *ab initio* utiliza el hamiltoniano molecular verdadero y no hace uso de datos empíricos de cálculo. El método Hartree-Fock calcula el producto antisimetrizado Φ de spín-orbitales que minimizan la integral variacional (2), donde H es el hamiltoniano molecular verdadero. Por consiguiente, el método de Hartree-Fock es *ab initio*, como lo es el cálculo SCF que da sólo una aproximación a la función de onda Hartree-Fock debido al tamaño limitado de la base. Obviamente, debido a la forma

restringida de Φ , el método de Hartree-Fock no da la verdadera función de onda. Un cálculo CI basado en el orbital Hartree-Fock es, también un cálculo *ab initio* y puede dar la verdadera función de onda si se incluyen suficientes funciones de configuración.

Un método semiempírico utiliza un hamiltoniano más simple que el verdadero, utiliza datos empíricos para asignar valores a alguna de las integrales que aparecen en el cálculo y desprecia otras. La razón de recurrir a métodos semiempíricos es que cálculos precisos *ab initio* en moléculas razonablemente grandes requieren excesivos tiempos de computación.

Los métodos semiempíricos fueron desarrollados originalmente para moléculas orgánicas conjugadas, extendiéndose después para abarcar el resto de moléculas. En la década de 1930 se desarrolló el método Hückel basado fundamentalmente en considerar tan solo electrones pi, hoy día se usa raras veces.

Una versión mejorada del método Hückel, aplicable tanto a moléculas conjugadas como no, es el método de Hückel ampliado (EH), desarrollado entre los años 50 y 60. El método EH trata todos los electrones de valencia y desprecia menos integrales. La principal ventaja de estos métodos es la comprensión cualitativa que ofrecen del enlace químico, pero al utilizar hamiltonianos muy simplificados, no contienen términos de repulsión entre electrones. Se han desarrollado varias teorías semiempíricas mejoradas que incluyen en el hamiltoniano algunas de las repulsiones electrónicas. Estas incluyen las teorías CNDO, INDO, MINDO, MNDO, AM1, PM3 y SAM1. Estas teorías consideran solamente los electrones de valencia, resuelven ecuaciones análogas a las de Hartree-Fock para encontrar orbitales moleculares de campo autoconsciente, pero puesto que se utiliza un hamiltoniano aproximado, y se hacen aproximaciones drásticas para muchas de las integrales que se presentan, los orbitales moleculares hallados son sólo aproximaciones a los orbitales de Hartree-Fock.

Los métodos CNDO (complete neglect of differential overlap) e INDO (intermediate neglect of differential overlap) fueron desarrollados por Pople y colaboradores en la década de los 60. Los nombres indican la naturaleza de las aproximaciones hechas en cada teoría. Los métodos CNDO e INDO proporcionan geometrías moleculares razonablemente exactas, momentos

dipolares no muy buenos, potenciales de ionización inexactos, energías relativas de isómeros muy inexactas y energías de disociación pobres. El método MINDO (INDO modificado) fue desarrollado por Dewar y colaboradores entre 1960-1975 y ha evolucionado a través de versiones sucesivas MINDO/1, MINDO/2, MINDO/2' y MINDO/3. La intención de Dewar no fue tener un método que diera aproximaciones a los resultados de Hartree-Fock, sino que diera las geometrías moleculares y las energías de disociación de una forma precisa. Dewar fue capaz de compensar el hecho de despreciar la correlación electrónica que tiene lugar en la teoría de Hartree-Fock considerando calores de atomización. Para solventar deficiencias del método MINDO/3, Dewar y colaboradores desarrollaron en 1977 una nueva versión mejorada denominada MNDO (modified neglect of diatomic overlap). Una mejora del MNDO es el método AM1 (Austin Model 1) cuyo nombre hace referencia a la Universidad de Austin de Texas donde fue desarrollado. PM3 (parametric method 3) y SAM1 (semiempirical ab initio method 1) son versiones mejoradas de AM1. El método SAM1 calcula las integrales de repulsión electrónica de manera exacta usando una base mínima, mientras que los métodos MINDO, MNDO, AM1 y PM3 estiman estas integrales usando una fórmula sencilla que incluye parámetros cuyos valores se eligieron para dar buen resultado con moléculas ensayo. Por tanto, SAM1 necesita de mucho más tiempo de cálculo aun así, SAM1 es aún sustancialmente más rápido que los cálculos *ab initio* SCF.

Los métodos MINDO/3, MNDO, AM1, PM3 y SAM1 dan en general valores exactos de longitudes y ángulos de enlace, los ángulos diedros no se pueden calcular con exactitud usando estos métodos. Los momentos dipolares calculados dan valores buenos y los potenciales de ionización bastante exactos. Los métodos MINDO/3 y MNDO fallan en la predicción de la energía conformacional. Los métodos AM1 no dan valores exactos para la diferencia de energía entre conformeros, aunque a diferencia de MINDO/3 y MNDO, generalmente predice cuál es el conformero más estable.

La comparación de los resultados obtenidos mediante los métodos MNDO, AM1 y PM3 con los cálculos *ab initio* SCF de geometrías de equilibrio, barreras rotacionales internas y diferencias de energía entre isómeros y entre conformeros, muestran que los cálculos *ab initio* SCF dan generalmente valores más exactos que los métodos semiempíricos, siempre que se use una

base mínima adecuada. Aunque los cálculos *ab initio* no dan exactamente las energías moleculares de disociación, mientras que los métodos semiempíricos dan buenas aproximaciones, se pueden combinar los resultados de un cálculo *ab initio* SCF con parámetros empíricos para dar valores de energías de disociación en fase gaseosa que es generalmente más exacto que los obtenidos mediante cálculos semiempíricos.

Aunque los métodos semiempíricos no son en general tan exactos como los cálculos *ab initio* SCF, los cálculos semiempíricos permiten estudiar moléculas mucho mayores que los métodos *ab initio*, ya que un cálculo *ab initio* SCF necesita típicamente 10^3 veces más tiempo que un cálculo semiempírico de la misma molécula. Los cálculos *ab initio* están restringidos a moléculas con decenas de átomos, mientras que los cálculos semiempíricos pueden tratar moléculas de cientos de átomos.

Los cálculos semiempíricos son prometedores igualmente al permitir obtener información sobre mecanismos de reacción mediante el cálculo de la función de energía potencial para la interacción de las moléculas durante una reacción química.

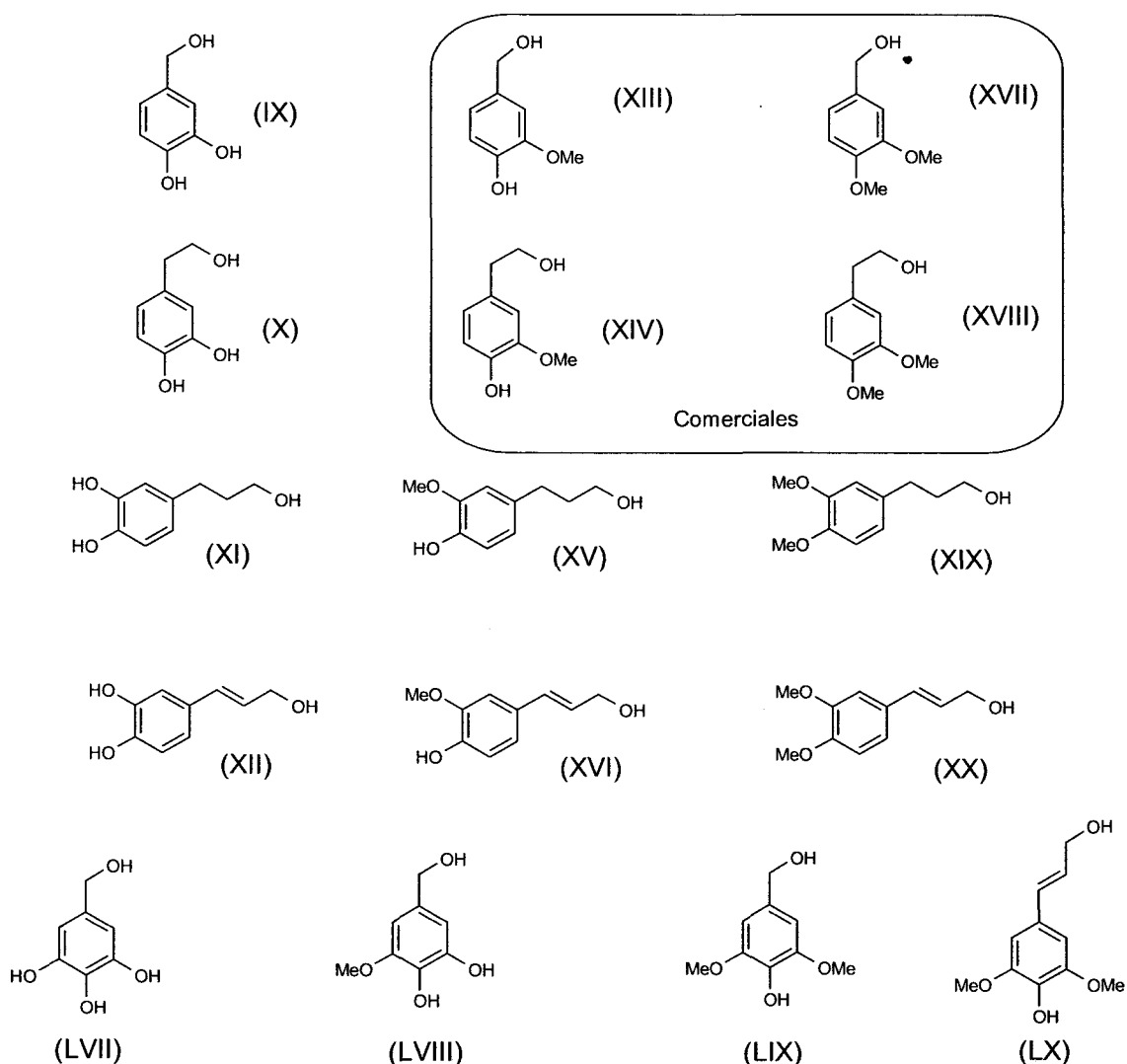
Comentar tan sólo que existe un método completamente empírico denominado método de mecánica molecular capaz de trabajar con moléculas muy grandes como proteínas de miles de átomos. Dicho método no es mecano-cuántico, ni usa un operador hamiltoniano, ni una función de onda. Por el contrario la molécula se visualiza como un conjunto de átomos unidos por enlaces, describiéndose la energía molecular electrónica en función de las coordenadas espaciales de los núcleos expresando la energía como suma de contribuciones de flexión, torsión tipo oscilador armónico y otras expresiones que incorporan interacciones entre los átomos no enlazados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 SÍNTESIS ALCOHOLES FENOLICOS DERIVADOS DE FENILPROPANOIDES.

De todos los alcoholes fenólicos elegidos como productos de partida para la síntesis de antioxidantes lipofílicos, tan sólo cuatro se pueden adquirir a través de casas comerciales, figura 58.



-Figura 58-

Para obtener el resto de compuestos debemos recurrir a la síntesis química a partir de sus correspondientes ácidos, para disponer de cantidades suficientes de cada uno de ellos. El método sintético elegido para sintetizar

estos alcoholes fenólicos ha sido la reducción con hidruro de aluminio y litio, por ser uno de los más versátiles empleados en bibliografía, además, se parte de productos que en principio no son demasiado sensibles a este reductor.

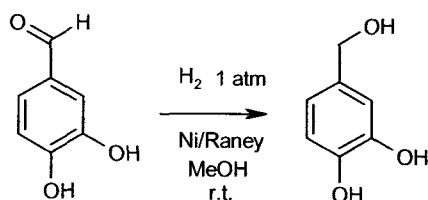
4.1.1 Preparación del alcohol 3,4 dihidroxibencílico (IX), (alcohol protocateico).

El alcohol protocateico, aparece en la naturaleza como intermedio en la biosíntesis de la vanillina, compuesto principal que constituye el aroma de vainilla (*Vanilla planifolia*) (Negishi et al, 1996).

El alcohol 3,4 dihidroxibencílico aparece en determinadas glándulas de los insectos como precursor para la formación de las estructuras que van a constituir las cutículas de los insectos (Pyne et al, 1990; Manickam et al, 1991). Además, junto con otros compuestos fenólicos, protegen la capa lipídica de la epidermis y las ceras de numerosos insectos de la autooxidación (Atkinson et al, 1973).

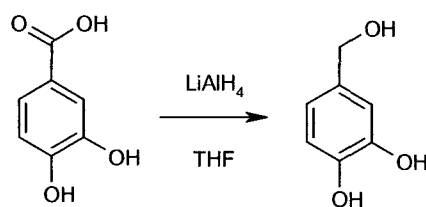
En bibliografía se encuentran recogidos varios métodos de síntesis para el alcohol 3,4 dihidroxibencílico. Prácticamente todos se basan en la reducción del ácido o del aldehído con alguno de los reductores normalmente empleados.

Casacuberta y colaboradores describen por primera vez, la obtención de alcoholes fenólicos, entre los que se encuentra el alcohol 3,4 dihidroxibencílico, a partir de los correspondientes aldehídos con el catalizador de Niquel-Raney en metanol, a temperatura ambiente y presión normal de hidrógeno, figura 59, (Casacuberta et al, 1963; Mefford et al 1996).



-Figura 59-

Atkinson y colaboradores (Atkinson et al, 1973) lo obtienen por reducción del ácido con hidruro de aluminio y litio en THF siguiendo las pautas dadas por Fieser y Fieser, figura 60, (Fieser y Fieser, 1967).

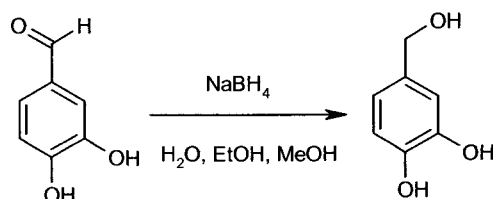


-Figura 60-

Nikaido y colaboradores lo obtienen por reducción del aldehído con hidruro de aluminio y litio en éter seco, (Nikaido et al, 1984).

Kawai y colaboradores realizan la reducción del aldehído en metanol con hidrógeno en paladio sobre carbono para obtener el alcohol en cuestión (Kawai et al, 1991).

Aunque el método del que más referencias bibliográficas se encuentran es en el que se reduce el aldehído empleando borohidruro sódico en distintos disolventes polares; agua (Sugumaran et al, 1990;), etanol (Kramer et al, 1991) o metanol, figura 61, (Negishi et al, 1996).

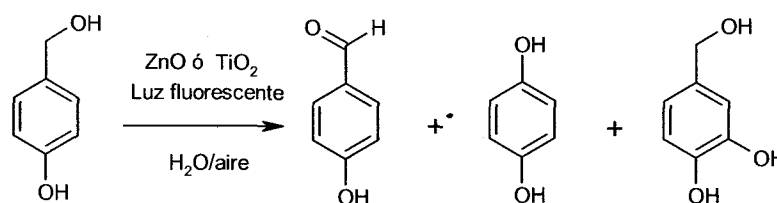


-Figura 61-

Saliéndonos de la síntesis química clásica nos encontramos con varios métodos donde se obtiene también el alcohol 3,4 dihidroxibencilico como producto final de reacción.

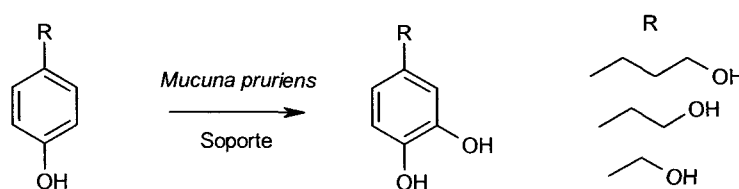
Richard, C. desarrolla un método donde transforma mediante una reacción fotocatalítica, p-hidroxibenzil alcohol empleando ZnO o TiO_2 en medio acuoso. En la reacción aparecen otros dos productos, siendo el porcentaje de cada uno de ellos variable, en función de las condiciones de reacción empleadas, figura 62, (Richard C., 1993). Los óxidos fotoactivos ZnO y TiO_2 se excitan mediante energía lumínica creándose agujeros positivos (h^+) como consecuencia de la pérdida de electrones de la banda de conducción. Estos electrones reducen el oxígeno del aire a radical superóxido, O_2^- , mientras que los agujeros positivos de la banda de conducción oxidan al agua hasta radical

hidroxilo. Estas especies se consideran como las principales responsables de las fototransformaciones que ocurren sobre sustratos orgánicos.



-Figura 62-

Pras y colaboradores realizan una biotransformación de varios monofenoles sustituidos en *para* hasta el correspondiente catecol, empleando células de *Mucuna pruriens* inmovilizadas sobre alginato cálcico que se añade al medio de incubación. Los productos quedan en disolución purificándose mediante un procedimiento relativamente sencillo, figura 63, (Pras et al, 1988).



-Figura 63-

Estas dos biotransformaciones constituyen, como iremos viendo más adelante, el único método sintético encontrado en bibliografía de varios de los demás alcoholes que integran esta tesis doctoral.

El alcohol 3,4 dihidroxibencílico se ha sintetizado por reducción del ácido 3,4 dihidroxibenzoico con 2.5 equivalentes de hidruro de aluminio y litio en THF a reflujo, el crudo se extrae con acetato de etilo y se purifica en columna con rendimientos en torno al 70%. A parte de las precauciones que conlleva el empleo de hidruro de aluminio y litio, el procedimiento resulta sencillo y eficaz para la obtención alcoholes bencílicos, figura 60.

4.1.2 Preparación de 2-(3,4 dihidroxifenil) etanol (X), (hidroxitirosol).

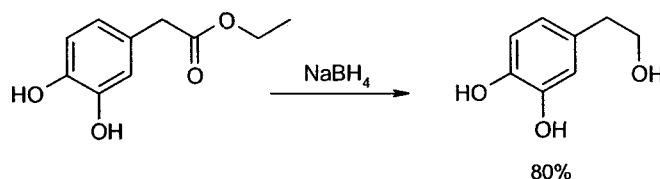
El 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (hidroxitirosol), es uno de los componente fenólicos mayoritarios encontrado en el aceite de oliva, considerado como el principal responsable de su efecto antioxidante. El hidroxitirosol proviene de la hidrólisis de la oleuropeina, principal glucosido secoirideo encontrado en el olivo y en otras plantas de la familia de las oleáceas (fresno, aligustre) (Soler-Rivas et al, 2000).

El hitroxitirosol no se encuentra disponible comercialmente, y hay que recurrir para su obtención a procesos de extracción a partir de sus fuentes naturales o a procedimientos sintéticos (Capasso et al, 1999).

En la literatura se encuentran recogidos distintos procesos de extracción y purificación cromatográfica de hidroxitirosol a partir de los residuos de la industria del aceite (orujo, alpechin, aguas de lavado de la aceituna, hojas etc.), pero la forma más conveniente consiste es recurrir a reacciones de síntesis, que resultan menos laboriosos que los procedimientos de extracción.

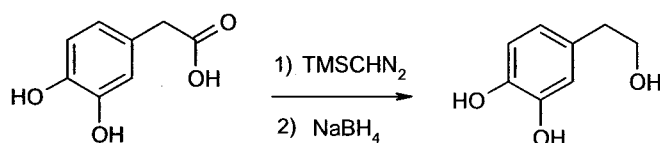
Los métodos de síntesis de hidroxitirosol encontrados en la bibliografía suelen emplear como producto de partida el ácido 3,4 dihidroxifenil acético diferenciándose básicamente en el tipo de reductor empleado en las distintas condiciones de reacción.

Bianco y colaboradores emplean borohidruro sódico para reducir el éster etílico del ácido 3,4 dihidroxifenil acético, obteniéndose el hidroxitirosol con un 80% de rendimiento, figura 64, (Bianco et al, 1988).



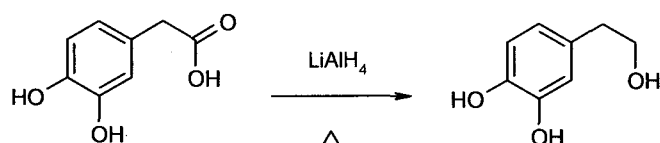
-Figura 64-

Bai y colaboradores emplean trimetilsilil diazometano como agente metilante suave, el producto formado se reduce posteriormente con borohidruro sódico en medio acuoso a 0 °C durante 1.5 horas, figura 65, (Bai et al, 1998).



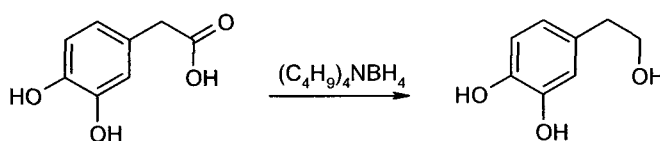
-Figura 65-

El método que emplea Capasso y colaboradores consiste en la reducción directa del ácido 3,4 dihidroxifenil acético con LiAlH₄ en THF a reflujo durante 2 horas, figura 66, (Capasso et al, 1999).



-Figura 66-

Tuck y colaboradores consiguen la reducción del ácido 3,4 dihidroxifenil acético con el reductor borohidruro de tetrabutil amonio generado *in situ* a partir del hidrógeno sulfato de tetrabutilamonio con borohidruro sódico en medio básico. Una vez generado el reductor, la reacción transcurre en condiciones muy suaves en THF a temperatura ambiente durante dos horas, figura 67, (Tuck et al, 2000).



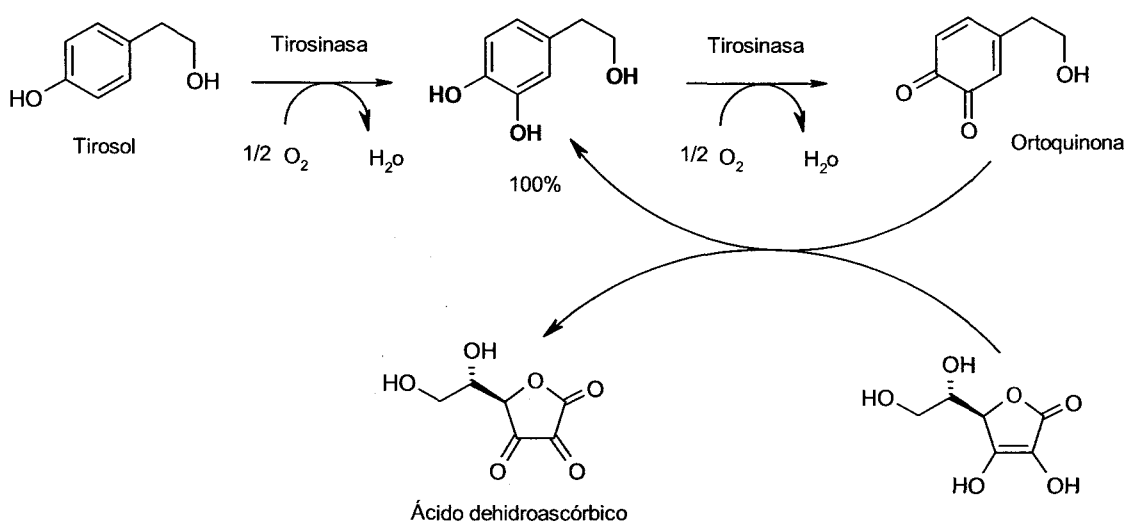
-Figura 67-

Existen otros métodos encontrados en la literatura (Schöpf et al, 1949), (Baraldi et al, 1983), (Verhe et al, 1992), que presentan ciertas desventajas con respecto a los enumerados anteriormente, como por ejemplo, transcurren con más de una etapa de reacción y con bajos rendimientos, por debajo del 40% en alguno de los casos.

Se encuentran además varias biotransformaciones entre las que destacan la síntesis enzimática que realizan Espín y colaboradores con

tirosinasa de champiñon y la biotransformación con *Mucuna pruriens* de Pras, descrita anteriormente, figura 63, (Pras et al, 1988).

La tirosinasa de champiñon cataliza la ortohidroxilación y posterior oxidación del tirosol hasta 3,4 quinonafenil etanol en tampón fosfato a pH=6.5. La adición de ácido ascórbico promueve la reducción de la orto-quinona para formar hidroxitirosol. El procedimiento transcurre de forma limpia con rendimientos del 100% empleando reactivos autorizados en alimentación y se ha propuesto como un método eficaz para la producción de hidroxitirosol de forma industrial para su posible inclusión en alimentos, figura 68, (Espín et al ,2001; Solicitud de patente P200002073).



-Figura 68-

La síntesis de 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol se ha realizado introduciendo ligeras modificaciones al protocolo original de Capasso, reduciendo el ácido 3,4 dihidroxifenil acético con tres equivalentes de hidruro de aluminio y litio en THF a reflujo durante 3 horas, obteniéndose el producto con rendimientos por encima del 85%, figura 66.

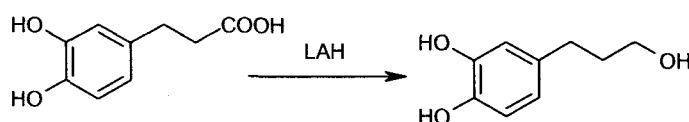
Diversos autores indican descensos en el rendimiento después de la purificación cromatográfica y el aislamiento del hidroxitirosol como un sirupo amarillento. La purificación resulta tediosa ya que el producto se retiene bastante en la columna, conforme pasa el tiempo el compuesto va adquiriendo una ligera coloración amarilla-parda probablemente como consecuencia de su permanencia en la columna y no cristaliza. Se ha optimizado la etapa cromatográfica modificando la fase móvil empleada normalmente en la

bibliografía, mezclas de éter de petróleo: acetato de etilo por mezclas de hexano : éter. El producto se obtiene como un sirupo transparente que cristaliza después de secarlo a alto vacío durante 24 horas. La pureza del compuesto se ha estimado en base a datos de RMN y HPLC superior al 99%.

4.1.3 Preparación de 3-(3,4 dihidroxifenil) propanol (XI), (Alcohol dihidrocafeílico).

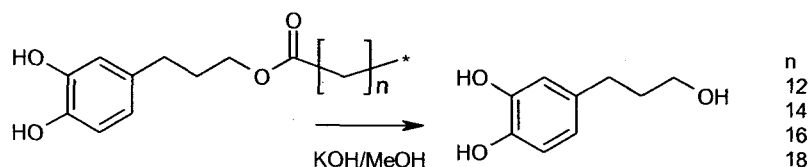
El 3-(3,4 dihidroxifenil) propanol o alcohol dihidrocafeílico se ha identificado como uno de los principales fenilpropanoides presentes en la familia de los tejos, *Taxus baccata* (Jetter et al, 2002; Das et al, 1993), *Taxus mairei* (Yang et al, 1999), además de en otras especies de plantas como *Onopordon corimbozum* (Pedro et al, 1990) o *Carthamus arborescens* (Barrero et al, 1997).

Aparece un método sintético en la literatura para la síntesis del 3-(3,4 dihidroxifenil) propanol a partir del ácido dihidrocafeico (o 3,4 dihidroxifenil propanoico) e hidruro de aluminio y litio como reductor, (Shibata et al, 1975), y que emplean posteriormente otros autores cuando necesitan disponer de este compuesto, figura 68, (Krauss et al 1997; Jetter et al, 2002). El resto de autores lo identifican en los extractos de plantas tan solo por comparación con los datos espectroscópicos publicados (Das et al, 1992; Pedro et al, 1990).



-Figura 68-

Barrero y colaboradores lo obtienen por hidrólisis con potasa metanólica y posterior extracción en éter de una mezcla de ésteres de fenilpropanoides aislados de las partes aéreas de *Phonus arborescens* (*Carthamus arborescens*), planta medicinal que se encuentra en el sur de España y el norte de África (Barrero et al, 1997).



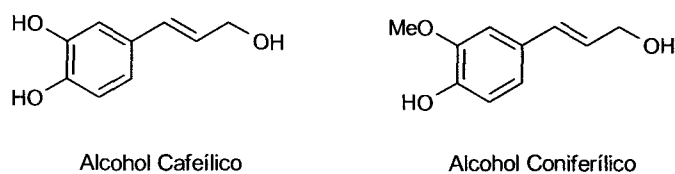
-Figura 69-

Pras y colaboradores obtienen también este alcohol mediante la biotransformación con *Mucuna pruriens*, descrita anteriormente, a partir del correspondiente monofenol, figura 63.

La síntesis del 3-(3,4 dihidroxifenil) propanol se ha realizado de forma análoga a la del hidroxitirosol, a partir del ácido dihidrocafeico con LAH en THF a reflujo durante 3 horas y posterior extracción y purificación cromatográfica, con un rendimiento por encima del 70%, figura 68.

4.1.4 Preparación de alcohol 3,4 dihidroxicinámico (XII), (alcohol cafeílico).

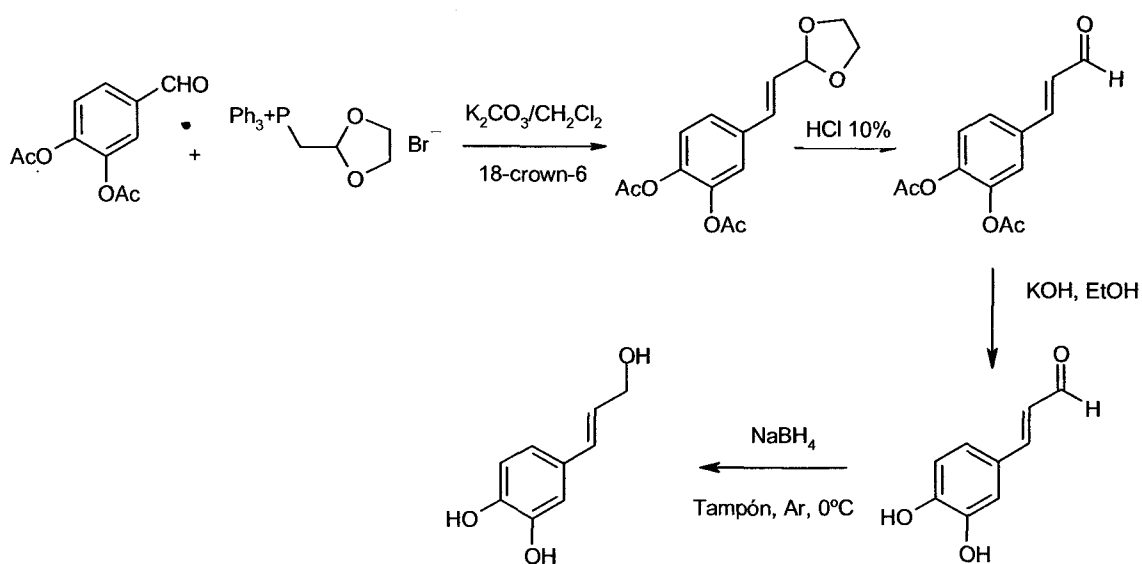
Los alcoholes cafeílico, coniferílico y sinapílico constituyen tres de los principales metabolitos cinámicos precursores de la biosíntesis de lignina, figura 70, (Matsui et al, 2000). La lignina, después de la celulosa, es el segundo biopolímero más abundante de la naturaleza, contribuye en gran parte a la impermeabilidad, la fuerza y resistencia a degradación enzimática de la pared celular de los vegetales (Ralph et al, 1997).



-Figura 70-

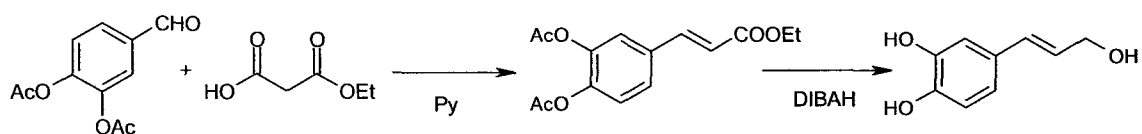
El problema de esta reducción es la aparición con distintos porcentajes del subproducto consecuencia de la reducción del doble enlace, también llamado producto de reducción 1-4. Los métodos de síntesis encontrados en la bibliografía emplean reductores no muy energéticos para evitar afectar al doble enlace de la molécula. Algunos de estos métodos se desarrollan en varias etapas de reacción y con moderados rendimientos.

Dixon y colaboradores sintetizan el alcohol 3,4 dihidroxicinámico, alcohol cafeílico, a partir de 3,4 diacetoxibenzaldeído mediante una reacción de Wittig con bromuro de (1,3-dioxolanil-metil)-trifenilfosfonio y posterior reducción del aldehído, en condiciones de catálisis de transferencia de fase con borohidruro sódico en un sistema tampón, figura 71, (Dixon et al, 2001). Este tipo de reducción, como veremos más adelante, fue empleada con anterioridad por Daubresse y colaboradores para la síntesis del alcohol coniferílico a partir del coniferaldehído, (Daubresse et al, 1994).



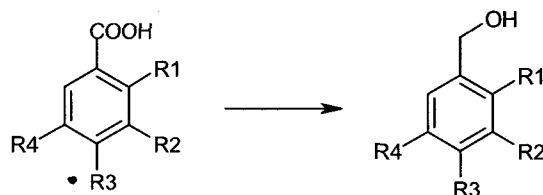
-Figura 71-

Otra metodología desarrollada por Parvathi y colaboradores, que comprende también varios pasos de reacción, parte del 3,4 dihidroxibenzaldehído, se acetilan las posiciones fenólicas y se condensa con el monoetil malonato siguiendo el procedimiento de Umezawa (Umezawa et al, 1991). El etil ferulato resultante se reduce con hidruro diisobutilaluminio (DIBAH) y se desacetila obteniéndose el alcohol cafeílico con bajos rendimientos, figura 72, (Parvathi et al, 2001).

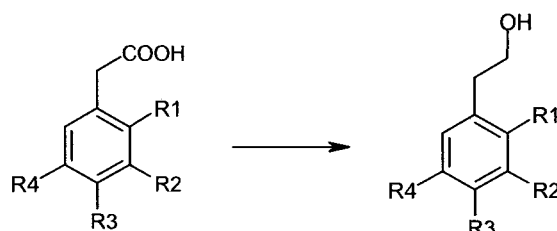


-Figura 72-

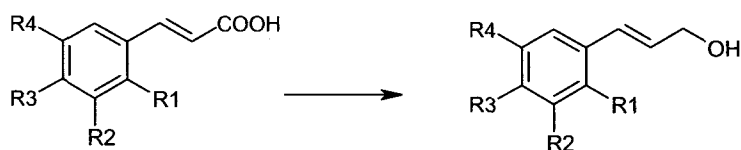
Un último ejemplo lo constituye el trabajo de Arfmann y colaboradores donde reducen el grupo carboxílico de distintos ácidos benzoicos, cinámicos y fenilacéticos probando 20 microorganismos distintos, mayoritariamente hongos. Los resultados son en general bastante buenos, algunos con rendimientos superiores al 80% (Arfmann et al, 1993). Entre los alcoholes que obtienen en estas biotransformaciones se encuentran el alcohol cafeílico y el coniferílico, figura 73.



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
OCH ₃	H	H	H
H	OCH ₃	H	H
H	H	OCH ₃	H
H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
H	OCH ₃	OH	H
OH	H	H	H
H	OH	H	H
H	H	OH	H



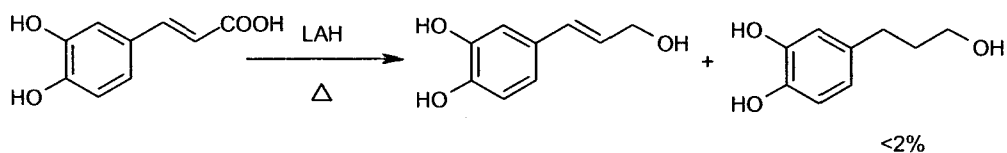
R ₁	R ₂	R ₃
H	H	OH
OH	H	H
H	OH	H
OCH ₃	H	H
H	OCH ₃	H
H	H	OCH ₃



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
H	H	H	H
OCH ₃	H	H	H
OCH ₃	H	H	OCH ₃
H	OCH ₃	OCH ₃	H
H	OCH ₃	H	OCH ₃
OH	H	H	H
H	OH	H	H
H	H	OH	H
H	OH	OH	H
H	OCH ₃	OH	H

-Figura 73-

La síntesis de alcohol 3,4 dihidroxicinámico, alcohol cafeílico, se ha realizado en una sola etapa de reacción por reducción del ácido 3,4 dihidroxicinámico (ácido cafeico) con hidruro de aluminio y litio en THF a reflujo durante 3 horas, y se procesa de forma similar que los anteriores ejemplos. El compuesto se obtiene con rendimientos en torno al 60%, observándose la formación del 3,4 dihidroxifenil propanol por debajo de un 2%, figura 74.

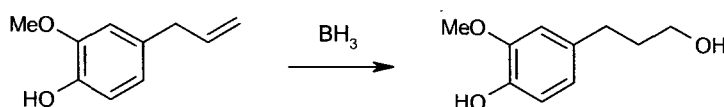


-Figura 74-

4.1.5 Preparación de 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) propanol (XV), (alcohol dihidroconiferílico).

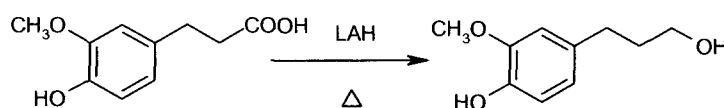
El alcohol dihidroconiferílico se encuentra también formando parte de los polímeros de lignina, aunque en niveles menores que otros alcoholes cinámicos (Brunow et al, 1998). No aparecen muchos métodos sintéticos en la literatura, aunque se referencia como subproducto principal de la reducción del coniferaldehído con distintos reductores, como seguidamente comentaremos.

Entre los procedimientos encontrados cabe destacar la síntesis que realizan Shibata y colaboradores a partir del eugenol por el procedimiento general de hidroborcación de dobles enlaces, figura 75, (Shibata et al, 1975).



-Figura 75-

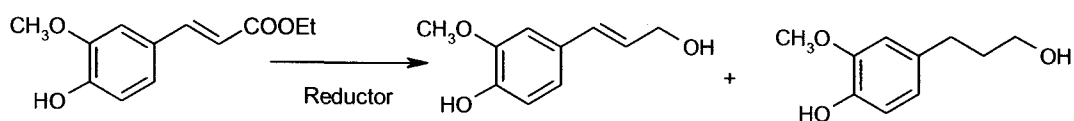
La síntesis del 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) propanol (Alcohol dihidroconiferílico) se ha realizado mediante reducción con hidruro de aluminio y litio del ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) propiónico (ácido dihidroferúlico) en THF a reflujo con rendimientos por enzima del 65%, figura 76.



-Figura 76-

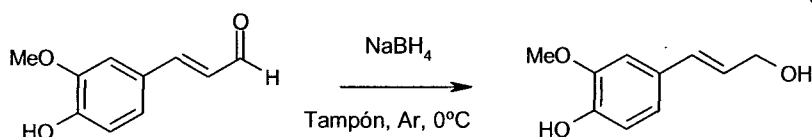
4.1.6 Preparación del alcohol 4-hidroxi-3-metoxicinamílico (XVI), (alcohol coniferílico).

Aparecen en la literatura distintos métodos de obtención del alcohol coniferílico por reducción de ferulato de etilo con hidruro de aluminio y litio (Swaleh et al, 1969), bis(2-metoxietil) hidruro de sodio y aluminio (Shibata et al, 1975) o diisobutil hidruro de aluminio (DIBAH) (Newman et al, 1986). El problema de estos métodos es la aparición en distintos porcentajes del subproducto de reducción 1-4, figura 77.



-Figura 77-

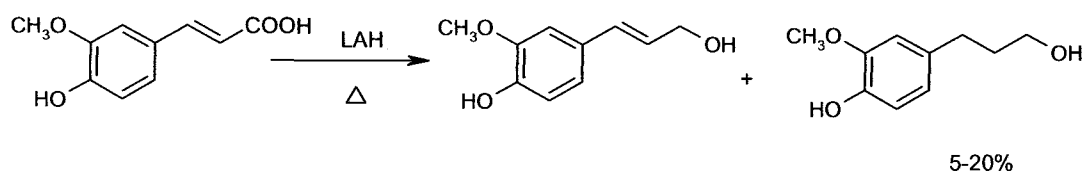
El método de Daubresse y colaboradores para la síntesis de alcohol coniferílico y de otros alcoholes cinámicos reduce el correspondiente aldehído en un medio tamponado empleando borohidruro sódico y baja temperatura, sin observarse aparición de los productos de reducción 1,4, figura 78, (Daubresse et al, 1994).



-Figura 78-

De forma similar, Ralph y colaboradores emplean también la reducción del aldehído coniferílico con borohidruro sódico en acetato de etilo y a temperatura ambiente, sin que tampoco se observe la aparición del compuesto saturado (Ralph et al, 1996).

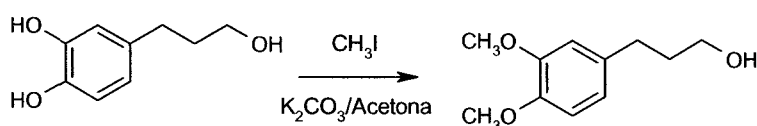
La síntesis del alcohol 4-hidroxi-3-metoxicinámico, alcohol coniferílico se ha realizado por reducción del ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (ácido ferúlico) con hidruro de aluminio y litio en THF a reflujo. En la reacción se producen porcentajes entre el 5% y el 20% del compuesto de reducción 1,4 en función de la cantidad de reductor empleado y del tiempo de reacción, figura 79. Las mejores condiciones se han obtenido con 1.5 equivalentes de reductor y dos horas de reacción. El producto se obtiene en un 68% de rendimiento con una pureza en torno al 95% según los datos de RMN.



-Figura 79-

4.1.7 Preparación de 3-(3,4-dimetoxifenil) propanol (XIX).

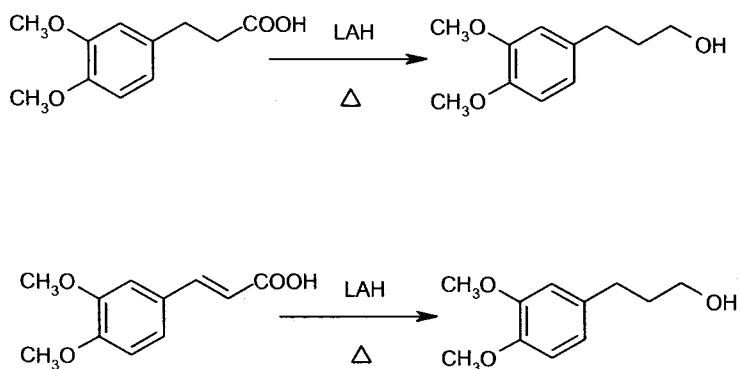
No aparecen demasiadas referencias a este producto en bibliografía y en principio no parece demasiado interesante, desde un punto de vista de actividad antioxidante, ya que no dispone de hidroxilos fenólicos. Shibata y colaboradores sintetizan el 3-(3,4-dimetoxifenil) propanol por metilación del alcohol dihidroconiferílico con yoduro de metilo en acetona anhidra y empleando como base carbonato potásico anhidro, figura 80.



-Figura 80-

La síntesis de 3-(3,4-dimetoxifenil) propanol se ha realizado por reducción con hidruro de aluminio y litio de forma similar a los ejemplos anteriores, a partir del correspondiente ácido (3,4-dimetoxifenil) propanoico. El producto se obtiene de forma rápida con buenos rendimientos, figura 81.

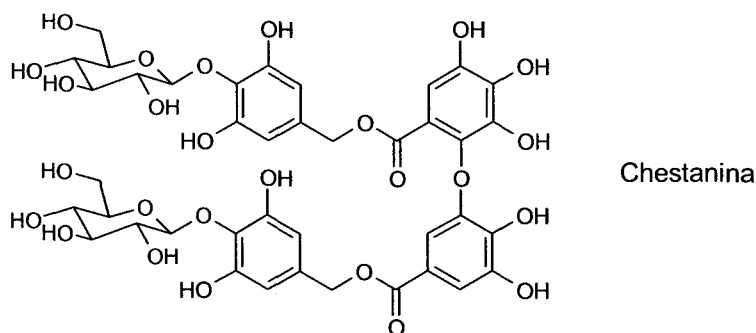
Este mismo compuesto se ha obtenido a partir del ácido 3,4 dimetoxicinámico, cuando se ha empleado como producto de partida en los intentos de síntesis del alcohol 3,4-dimetoxicinámico, figura 81. En todos los casos ensayados, se produce reducción simultánea del doble enlace olefínico y del grupo carboxilo.



-Figura 81-

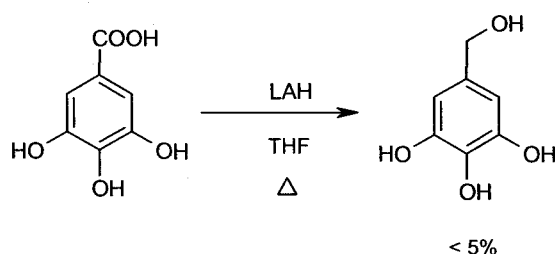
4.1.8 Preparación del alcohol 3,4,5 trihidroxibencílico (LVII), (alcohol gálico).

El alcohol 3,4,5 trihidroxibencílico o alcohol gálico se encuentra en la naturaleza exclusivamente en las plantas de la familias de los castaños, formando parte de una estructura tanínica denominada chestanina que se aísla de zonas de la planta dañadas por insectos, bacterias, hongos o de forma mecánica, figura 82 (Yoshironi et al, 1978).



-Figura 82-

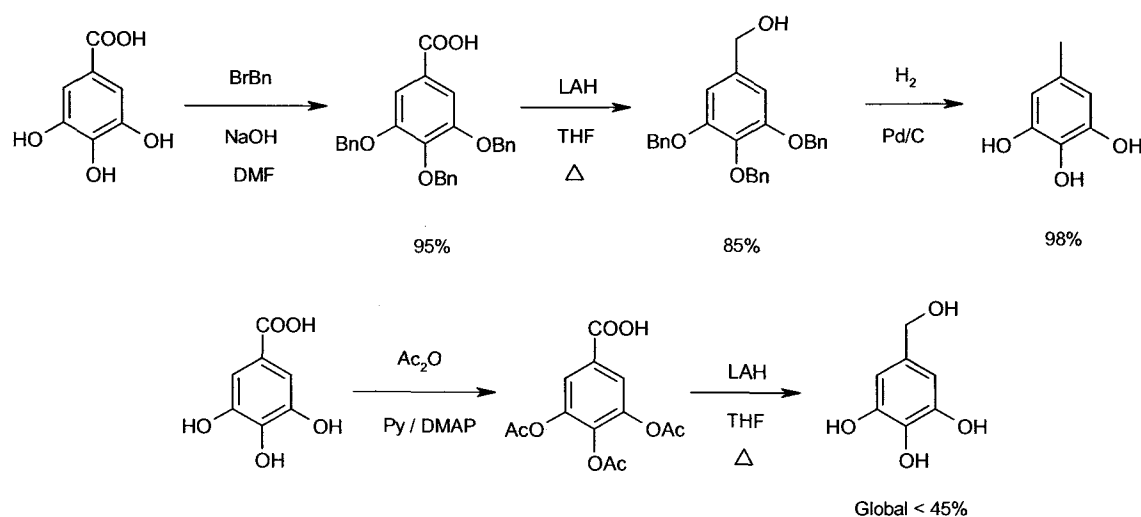
No se han encontrado métodos sintéticos en la bibliografía para este compuesto. En una primera aproximación se probó la síntesis de forma análoga a la seguida hasta ahora para la obtención de los alcoholes fenólicos a partir del ácido gálico empleando hidruro de aluminio y litio como reductor en THF a reflujo, obteniéndose el alcohol gálico en muy bajo rendimiento (<5%) entre una mezcla compleja de subproductos no deseados, figura 83.



-Figura 83-

Estos bajos rendimientos pueden ser debidos a la presencia de una molécula de agua en el ácido gálico empleado como producto de partida (ácido gálico monohidrato, obtenido a través de Fluka) o a tantos grupos hidroxilo que desactiven al reductor. El empleo de ácido gálico anhidro no mejora sustancialmente los rendimientos (7-10%), por lo que se optó por la protección de los grupos hidroxilo previamente a la reducción con LAH. En una primera

experiencia se protegieron los hidroxilos fenólicos con grupos bencilo, prácticamente de forma cuantitativa, y se redujo la molécula con hidruro de aluminio y litio en THF de forma análoga a los anteriores casos obteniéndose el correspondiente alcohol tribencilado con muy buenos rendimientos, por encima del 85%. La desprotección de la molécula con H_2 en Pd/C condujo a la formación de un subproducto no esperado, pero fácilmente explicable mecanísticamente, como consecuencia de la reducción simultanea del CH_2 bencilico obteniéndose el 3,4,5 trihidroxitolueno de forma cuantitativa en las condiciones de reacción empleadas, figura 84. Esta estrategia resulta ineficaz para la síntesis del alcohol gálico, por tanto se recurrió a la protección de los hidroxilos en forma de acetatos y posteriormente se realizó la reducción con LAH, el medio básico generado en la reacción provoca la hidrólisis simultánea de los acetatos y la formación del compuesto deseado, figura 84.



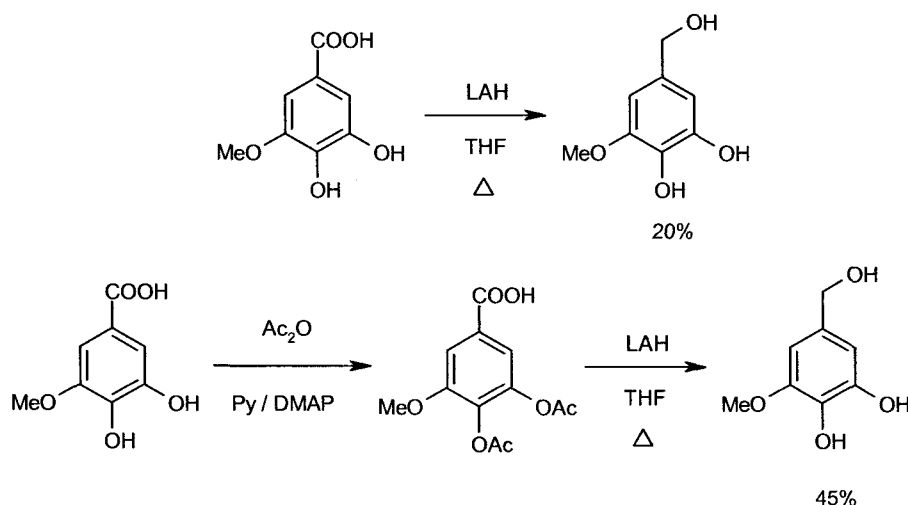
-Figura 84-

El método parece adecuado sin embargo se producen sustanciales pérdidas de rendimiento, en torno al 50%, durante la purificación cromatográfica, siendo este el principal inconveniente para la obtención de cantidades necesarias de este producto. Intentos de recristalización del compuesto a partir del crudo de reacción conducen al producto con restos importantes de ácido acético.

4.1.9 Síntesis del alcohol 3,4-dihidroxi-5-metoxi bencílico (LVIII), (alcohol metil gálico).

No se han encontrado referencias de la presencia de forma natural de este compuesto en la naturaleza.

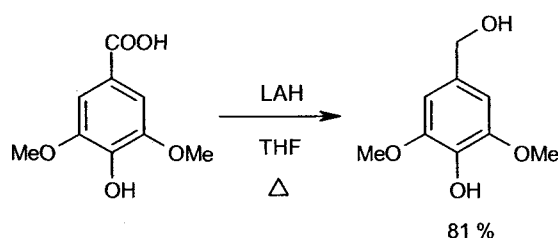
La obtención directa del compuesto a partir del ácido 3,4-dihidroxi-5-metoxi bencílico por reducción con LAH da lugar a la formación alcohol metil gálico con bajos rendimientos (15-20%). Por tanto se ha recurrido a la protección de los hidroxilos en forma de acetatos y posterior reducción y desprotección simultanea del compuesto con LAH de forma análoga a la anterior. El compuesto se obtiene de forma aceptable (45%) con ligeras pérdidas de rendimiento durante la etapa cromatográfica, figura 85.



-Figura 85-

4.1.10 Síntesis del alcohol 4-hidroxi-3,5-dimetoxi bencílico (LIX), (alcohol siringílico).

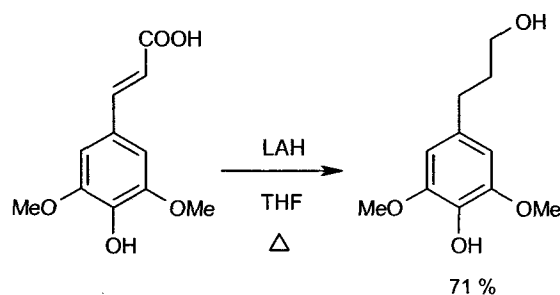
No se han encontrado referencias de este compuesto como producto natural. La síntesis del alcohol siringílico se ha realizado de forma similar a los anteriores casos mediante reducción con LAH del ácido siringico en THF a reflujo con buenos rendimientos, figura 86.



-Figura 86-

4.1.11 Síntesis del alcohol 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi) fenil propanol (LX), (alcohol dihidrosinápico).

La reducción del ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico (ácido sinápico) con LAH en THF a reflujo condujeron a la formación del producto de reducción 1,4 denominado alcohol dihidrosinápico, figura 87. Aunque algunos autores referencian la síntesis del alcohol sinápico (Daubresse et al, 1994; Ralph et al, 1996), finalmente se ha empleado el compuesto saturado ya que las conclusiones que con él se obtengan serán igualmente válidas en nuestro estudio comparativo.



-Figura 87-

Las estructuras de los distintos alcoholes fenólicos sintetizados han sido confirmadas mediante RMN de protones y carbono (^1H , ^{13}C) y espectrometría de masas FAB+. En los espectros de RMN se constata la reducción del ácido carboxílico y la presencia de la señal correspondiente al $-\text{CH}_2-$ oxigenado del alcohol primario entre 3.5-4.4 ppm y con la adecuada multiplicidad en los espectros de protones y entre 63.9-65.19 ppm en los de carbono. Tanto las señales de los protones y carbonos aromáticos, como las de los restantes grupos metileno e insaturaciones del esqueleto cinámico, aparecen claramente diferenciadas unas de otras en sus zonas habituales de desplazamientos químicos. Los espectros de masas confirman el peso molecular de los compuestos sintetizados.

4.2 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS NUEVOS COMPUESTOS.

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de la estructura química de las moléculas. El mecanismo generalmente aceptado como principal responsable de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es mediante su capacidad para atrapar los radicales libres. De forma general, podemos decir que la capacidad para atrapar los radicales libres de las moléculas está relacionada con la facilidad para donar los hidrógenos fenólicos así como con su capacidad para estabilizar los fenoxil radicales formados, factores íntimamente relacionados con la estructura química de la molécula (Mathiesen et al, 1997; Rice-Evans et al, 1996).

Disponemos de un grupo amplio de moléculas donde varía el número de hidroxilos, la presencia de grupos metoxilo o la longitud e insaturación de la cadena alifática. Queremos investigar las propiedades antioxidantes de estas moléculas de cara a sintetizar nuevos antioxidantes lipofílicos, además de estudiar las relaciones estructurales que rigen el comportamiento antioxidante de estas moléculas.

Aunque el principal parámetro que afecta a la actividad antioxidante es la capacidad de captación de radicales libres, el comportamiento antioxidante de estas moléculas en medios grasos, puede variar dependiendo de su capacidad de reparto en las distintas fases del alimento (Porter et al, 1993).

Schwarz y colaboradores sugirieron que el reparto de los antioxidantes en las distintas fases del alimento, depende principalmente de la polaridad de las moléculas. Ya que la peroxidación lipídica ocurre en la fase grasa y/o en la interfase, la proporción de antioxidante solubilizado en cada uno de estos entornos va a ser la verdadera responsable de la inhibición de la reacción en cadena (Schwarz et al, 1996). Una medida de la polaridad de las moléculas es la determinación de su coeficiente de partición octanol-agua, que da idea del comportamiento antioxidante que cabe esperar de las moléculas en distintos medios, aceite, emulsión etc. (Tsimidou et al, 2003); Se ha establecido como regla general de comportamiento a partir de distintos estudios experimentales, lo que se conoce con el nombre de paradoja polar que viene a exponer que "un antioxidante polar es más efectivo cuanto menos polar es el medio donde actúa y viceversa".

Los métodos elegidos en este trabajo para evaluar la actividad antioxidante de las nuevas moléculas, mediante su habilidad para capturar los radicales libres, así como la influencia que tiene el reparto entre fases de los antioxidantes en la inhibición de la peroxidación lipídica tanto en aceite crudo como en emulsión son:

- Determinación de la capacidad de captación de radicales libres mediante el método de DPPH.
- Determinación de la actividad antioxidante en aceites vegetales mediante Rancimat.
- Determinación de la actividad antioxidante en emulsión mediante el método del oxígeno activo (AOM).
- Determinación de la polaridad de las moléculas mediante la determinación del logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua, $\log(P)$.

Con los datos procedentes de estos experimentos estaremos en disposición de establecer cuales son los criterios estructurales y de reparto que rigen el comportamiento antioxidante de estas moléculas.

4.2.1 Determinación de la capacidad de captación de radicales libres (RSA) mediante el método de DPPH.

Hemos comentado previamente en los antecedentes el fundamento de los métodos de determinación de la capacidad antioxidante basados en la inhibición de la coloración de un radical cromogénico.

Los procedimientos analíticos para la determinación de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos encontrados en la literatura, difieren unos de otros en bastantes factores experimentales; (relación antioxidante/ radical, tiempo de reacción, solvente, etc.). Los resultados del orden de reactividad y magnitud antioxidante muchas veces difieren de un artículo publicado a otro. Tsimidou y colaboradores escriben, distintas recomendaciones para realizar estudios antioxidantes. Entre las recomendaciones que dan para la estandarización del método analítico está la realización de la reacción de inhibición a 20 minutos y con una relación molar entre antioxidante/ DPPH que

proporcione un valor de inhibición en la producción de radicales libres (RSA) entre el 60-80% en 10 minutos de reacción para el antioxidante más potente.

No aparecen en bibliografía datos de DPPH para la mayoría de los compuestos a ensayar, tan sólo para el hidroxitirosol y el alcohol homovanílico en distintos estudios de actividad antioxidante de compuestos fenólicos del aceite de oliva (Saija et al, 2000; Visioli et al, 1998; Gordon et al, 2001).

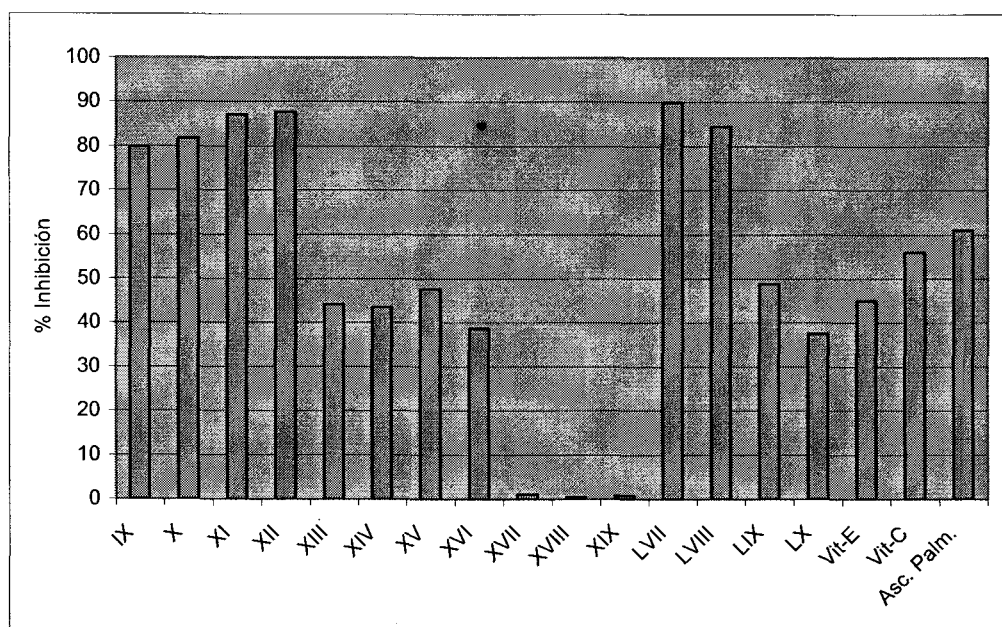
En base a estas referencias se ha establecido como criterio de evaluación de la actividad antioxidante de los nuevos compuestos, la inhibición producida una disolución de DPPH 125uM, a una concentración de 50uM del antioxidante.

De esta forma, se prepararon disoluciones de cada uno de los alcoholes (IX-XIX y LVII-LX) en un rango de 0.5 uM a 50 uM y se midió la reducción en la absorbancia de la disolución de DPPH (125uM) a cada de esas concentraciones, obteniéndose de la representación gráfica, los valores de EC_{50} y el % de inhibición a 50uM, para cada una de las moléculas ensayadas. Las determinaciones se realizaron por triplicado comparándose los resultados con los de antioxidantes que normalmente se emplean en alimentación.

En la figura 88 se representa el % de inhibición a 50uM de cada uno de estos antioxidantes junto con antioxidantes comerciales. Como se muestra en la figura, los compuestos con los hidroxilos libres en *orto* son los que presentan mejores porcentajes de inhibición del radical DPPH, mejores incluso que antioxidantes habitualmente empleados en alimentación. Los compuestos con una de las posiciones fenólicas metiladas, sufren importantes descensos en la actividad antioxidante, en torno al 50%, respecto a sus correspondientes hidroxilados, quedando su actividad antioxidante en el rango de los antioxidantes comerciales control. En ambos casos podemos observar cómo existe un ligero incremento de la actividad antioxidante conforme aumenta la longitud de la cadena lateral. Los compuestos con ambas posiciones metiladas, como puede verse en la gráfica, no son efectivos como inhibidores de la reacción radicalaria.

Cuando introducimos derivados del ácido gálico para ver como se modifica la actividad antioxidante de las estructuras observamos que la presencia de tercer hidroxilo como en el caso del alcohol gálico (LVII), vuelve a ser el factor que determina el aumento de la capacidad antioxidante de la

molécula. La introducción de un grupo metilo además del anillo de catecol, como en el caso del alcohol alcohol 5-metoxi, 3,4 dihidroxibencílico (metil gálico) aumenta la habilidad para donar hidrógenos proporcionando mejor actividad antioxidante que el correspondiente alcohol dihidroxibencílico. La presencia de un segundo grupo metilo, como en el caso del siringil y sinapil alcoholes, (LIX y LX) incrementa la actividad antioxidante de la molécula comparada con las del alcohol (4-hidroxi, 3-metoxi)bencílico (XIII) y del alcohol dihidroconiferílico (figura 88).



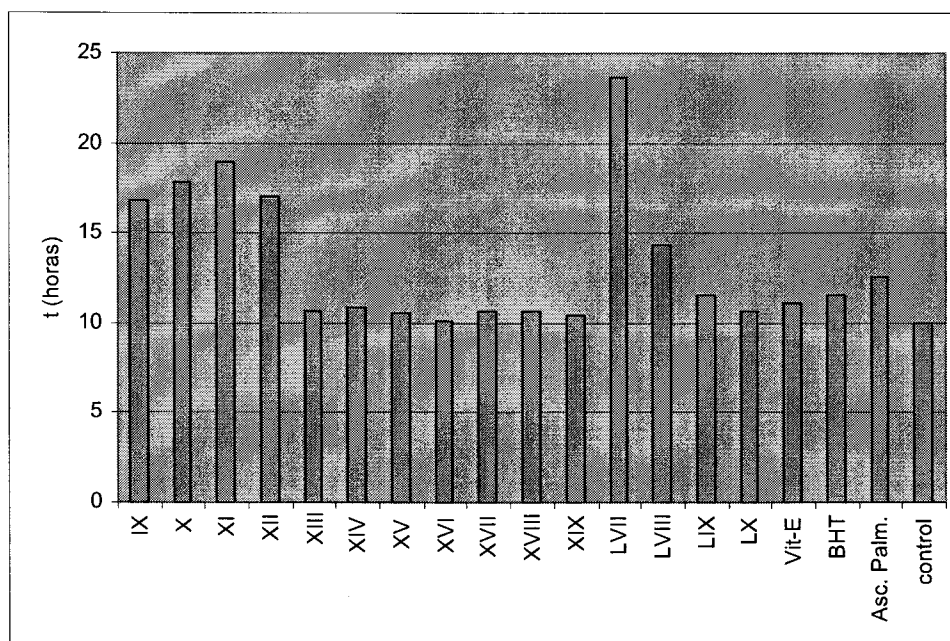
-Figura 88-

En cualquier caso, el factor más decisivo en la actividad antioxidante es el número de hidroxilos (Rice Evans et al, 1996), la contribución de los grupos OMe dadores de electrones, se pone de manifiesto solamente cuando no sustituyen al hidroxilo (Pekkarinen et al, 1999). La presencia de hidroxilos en orto produce estabilizaciones adicionales por resonancia y formación de orto-quinonas, de hay la importancia de mantener el anillo de catecol (Ho et al, 1997). La longitud de la cadena lateral, parece ser que influye en la deslocalización de la carga, y más aun, si presenta una insaturación (Graf et al, 1992; Tsimidou et al, 2003).

4.2.2 Determinación de la actividad antioxidante en aceites vegetales mediante Rancimat.

Los estudios se han realizado por debajo del límite legal de 200 ppm, establecido por la Unión Europea, para la adición de antioxidantes sintéticos a grasas y aceites destinados a la preparación de alimentos que se someten a tratamientos térmicos (EC. Off. J Comisión Eur. Communities 1995, Maech 18, regulation L61/95).

La evaluación de la actividad antioxidante de los alcoholes (IX-XIX y LVII-LX) en aceites se ha llevado a cabo por triplicado en un aparato Rancimat, de Metrohm-Herisau A. G. La oxidación se realizó pasando una corriente de aire (20L/h) a través de una alícuota de muestra*5 g de aceite de oliva, con cantidades de antioxidante de 100 ppm, colocadas en un reactor calentado a 120°C. La determinación se interrumpe automáticamente cuando el valor de conductividad en la celda de medida llega al máximo establecido de 200 uS.



-Figura 89-

La figura 89 representa el periodo de inducción de las muestras de aceite de oliva sometidas a oxidación forzada con cada uno de los antioxidantes ensayados, comparados con varios controles de antioxidantes habitualmente empleados en alimentación.

Las moléculas que presentan todos sus hidroxilos libres (IX-XII), proporcionan mejores resultados en base al tiempo de inducción que

cualquiera de los antioxidantes comerciales control utilizados. Los fenoles con la posición tres metilada (XIII-XVI) muestran valores del orden de los antioxidantes comerciales que generalmente se emplean.

Existen discrepancias en algunos compuestos, entre los valores de actividad antioxidante por el método del DPPH, y su valor correspondiente de período de inducción. Como por ejemplo el alcohol cafeílico, donde vemos que el doble enlace de la cadena, hace disminuir el valor de período de inducción, contrariamente a lo observado en la inhibición del radical DPPH. Realmente existen discrepancias entre los autores, del efecto que tiene la cadena propilénica en la actividad de distintos ácidos fenólicos. Algunos autores, aunque admiten la estabilización de la carga del radical que se produce a través del doble enlace, sugieren que el efecto que tiene la rigidificación de la molécula, causa impedimento estérico frente a la captura del radical (Silva et al, 2000; Bakalbassis et al, 2001).

En el caso del metil gálico, vemos que su período de inducción es también bajo en comparación con sus valores de DPPH, por contra, el alcohol gálico muestra un excelente período de inducción, por encima de cualquiera de los catecoles, no siendo tan marcadas estas diferencias cuando observamos los valores correspondientes de la inhibición del radical.

Excepto por estas discrepancias puntuales, el método basado en la inhibición del radical DPPH, parece que es adecuado para evaluar el comportamiento antioxidante de estos compuestos en una matriz real como es el aceite de oliva.

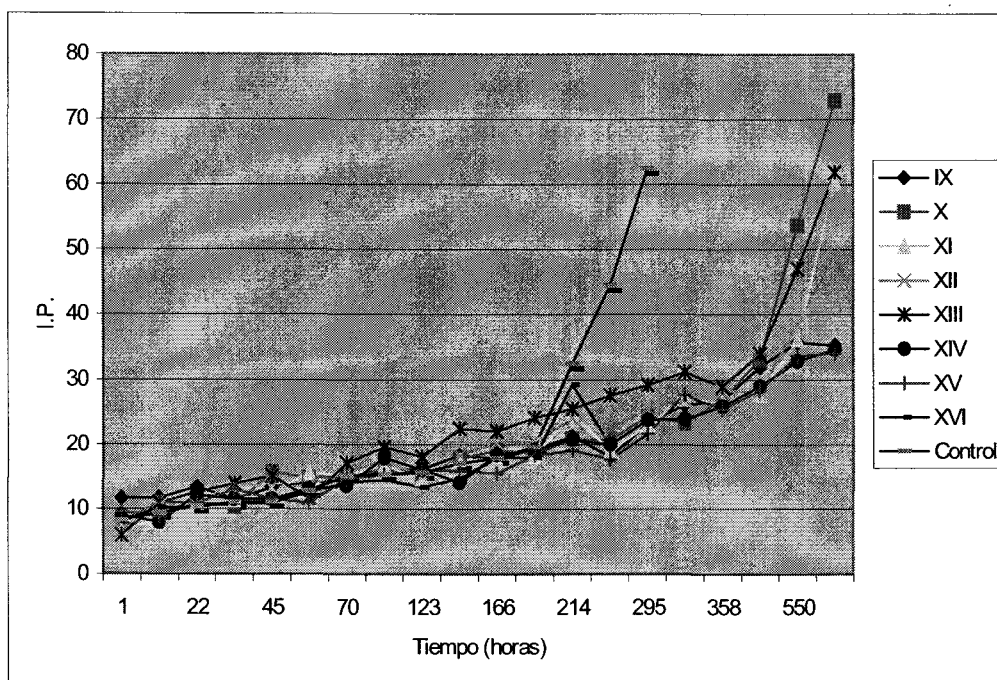
4.2.3 Determinación de la actividad antioxidante en emulsión mediante el método del oxígeno activo (AOM).

Por lo general la actividad antioxidante de las moléculas cambia drásticamente del aceite crudo al medio emulsionado.

La peroxidación lipídica ocurre dentro de la fase grasa y sobre la superficie micelar, la proporción de antioxidante disuelto en estos entornos es la verdadera responsable de la inhibición de la reacción de oxidación. Por eso, la actividad antioxidante de moléculas polares en sistemas dispersos depende de su comportamiento a la hora de producirse el reparto (Huang et al, 1996; Schwarz et al, 1996). Los antioxidantes polares suelen formar puentes de

hidrógeno con la fase acuosa reduciéndose su capacidad para donar hidrógeno y por tanto, su capacidad antioxidante (Ávila et al,1995). Coeficientes de partición en fase orgánica elevados se correlacionan con buenos resultados antioxidantes y viceversa (Lewis et al, 2002; Frankel et al, 2000).

Para evaluar la actividad antioxidantes en emulsión, se prepararon emulsiones aceite-agua al 30% y twen-20 como emulgente a partir de las disoluciones de 100 ppm de cada uno de los antioxidantes en aceite de oliva. Las muestras se introdujeron en un incubador a 45°C evaluándose el grado de oxidación mediante la determinación del índice de peróxidos, mediante el método oficial para la determinación de este parámetro, a distintos tiempos de oxidación, figura 90.



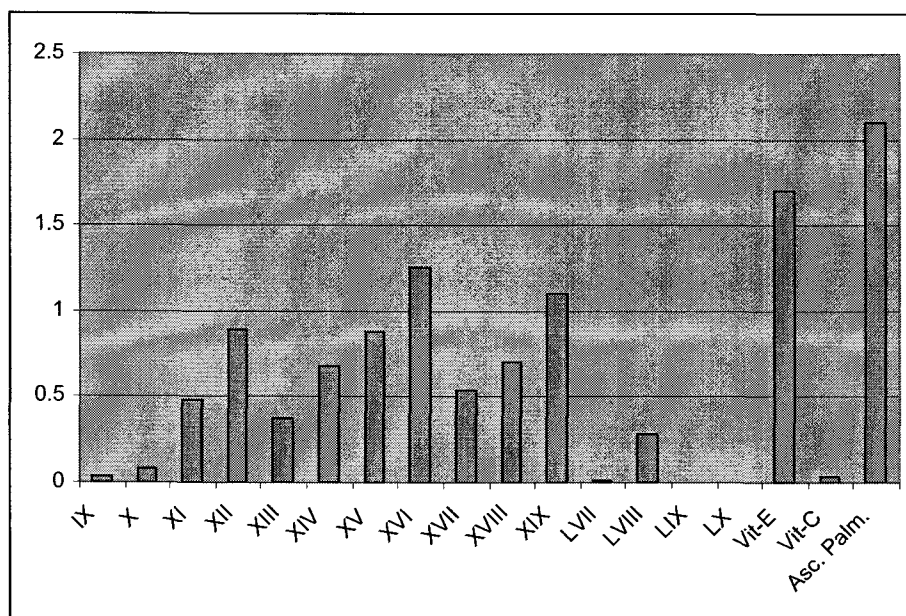
-Figura 90-

Como se observa en la figura, los alcoholes fenólicos que presentan todos los hidroxilos libres son peores antioxidantes en emulsión que los alcoholes que presentan el hidroxilo en tres metilado. Estos resultados están de acuerdo con la explicación que aporta Ávila y colaboradores (Ávila et al,1995), donde la formación de puentes de hidrógeno con la fase acuosa, hace disminuir la actividad antioxidante, siendo las moléculas metoxiladas más efectivas para la estabilización de medios emulsionados, que para la estabilización de aceites crudos.

4.2.4 Derminación de la polaridad de las moléculas mediante el logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua, $\log(P)$.

Se pretende determinar en que medida afectan los factores de reparto de los antioxidantes en el aceite o en el medio emulsionado, a la actividad antioxidante de las moléculas. El reparto que se produce de los antioxidantes en el aceite o la emulsión depende de la polaridad de los antioxidantes y de interacciones específicas con los diferentes constituyentes del sistema (Schwarz et al, 1996), usualmente se expresa en términos de coeficiente de partición, cuyos valores se obtienen experimentalmente (Vaes et al, 1998).

La medida del coeficiente de partición se realizó en una mezcla 1-octanol/ agua (1:1 vol:vol) a una concentración de 0.3 mM de cada uno de los antioxidantes en la fase orgánica. En la figura 91 se representan los valores de $\log(P)$ para cada uno de los alcoholes fenólicos (IX-XIX y LVII-LX) junto con varios antioxidantes comerciales.



-Figura 91-

En la figura 92 se comparan los valores de tiempo de rancimat de las moléculas, junto con los respectivos valores del coeficiente de partición.

Al aumentar la longitud de la cadena alifática del alcohol aumenta, como es lógico, el valor del $\log(P)$. Según predice la paradoja polar las moléculas más apolares son menos efectivas para estabilizar aceites crudos. En nuestro caso, conforme aumenta el $\log(P)$ de los alcoholes IX-XII, aumenta el periodo

de inducción del aceite. De igual forma, como en el caso de los alcoholes XII y XIII, el más polar no es el que estabiliza en mayor medida al aceite, sino al revés.

Por otro lado, en el medio emulsionado, también se encuentran ejemplos de moléculas con valores de $\log(P)$ inferiores, que estabilizan en mayor medida el medio emulsionado, como por ejemplo los alcoholes XI y XII o el XII y XIV.

Estos dos ejemplos constituyen algunas de las excepciones a la paradoja polar que se encuentran estudiando con detalle los datos experimentales obtenidos.

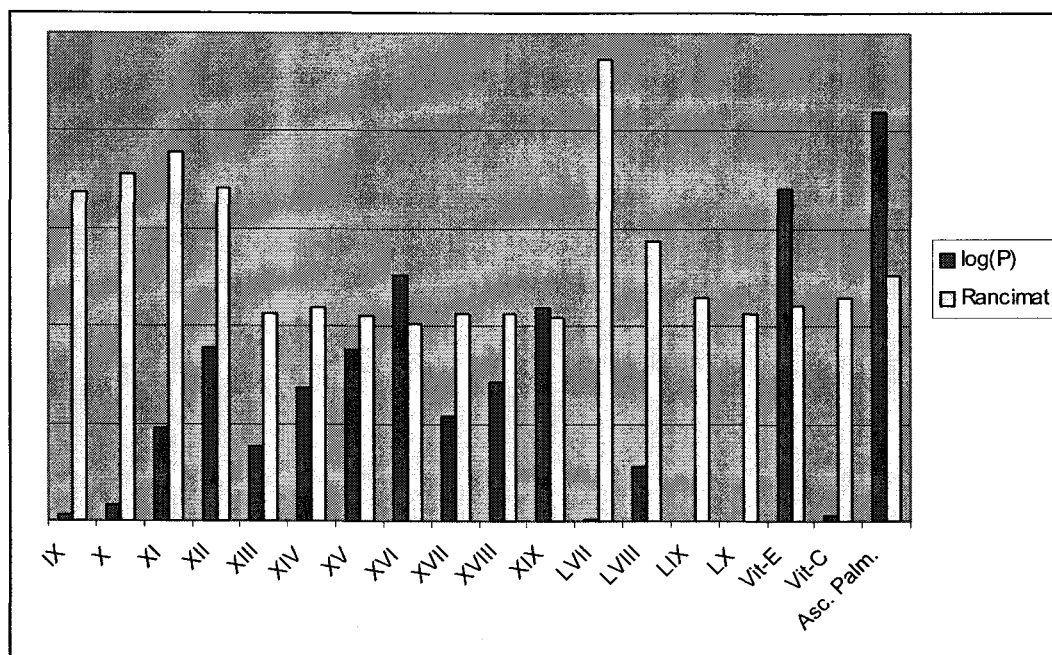


Figura 92-

Este comportamiento se pueden explicar suponiendo que los factores estructurales que afectan a la habilidad de las moléculas para donar hidrógeno así como los factores relacionados con la facilidad para estabilizar radicales a través de la cadena, o la formación de puentes de hidrógeno en presencia de fase acuosa, predominan sobre los factores de reparto del antioxidante en la fase grasa.

Conforme aumenta la lipofilia de las moléculas, aumenta la estabilidad del aceite, siempre y cuando se mantenga el anillo de catecol como principal responsable estructural de la actividad antioxidante. En emulsión, las estructuras más efectivas son aquellas que reducen la formación de puentes de

hidrógeno con la fase acuosa, pero que conservan habilidad para atrapar radicales y deslocalizar la carga.

En base a los datos de actividad antioxidante, en aceites crudos como en emulsión, vamos a diferenciar dos grupos a la hora de realizar la síntesis de nuevos antioxidantes lipofílicos derivados de estas moléculas.

Por tanto, las moléculas con hidroxilos fenólicos libres (IX-XII) van a servir como punto de partida para la síntesis de antioxidantes lipofílicos para la estabilización de aceites crudos. Mientras que los derivados que presentan la posición tres metilada (XIII-XVI), se van a emplear en la síntesis de antioxidantes lipofílicos para su aplicación en emulsiones. Los alcoholes completamente metilados (XVII-XIX) en las posiciones fenólicas, quedan descartados.

La solubilización de moléculas polares en medios hidrófobos es un proceso de claro interés en la industria alimentaria. Constituye un método eficaz de modificar las propiedades de solubilidad, miscibilidad y actividad antioxidante de las moléculas. La naturaleza hidrofílica de muchos antioxidantes naturales les hace tener una seria restricción a la hora de estabilizar grasas, más aun, como hemos visto, cuando además se encuentra presente una fase acuosa (Schuler, P. 1990).

La modificación sintética propuesta consiste en la esterificación del hidroxilo de la posición primaria de los anteriores alcoholes fenólicos junto a ácidos grasos de distinta naturaleza, la variación en la longitud y naturaleza del ácido graso nos va a permitir tener un amplio rango antioxidantes con distintas propiedades (punto de fusión, viscosidad, solubilidad, etc.), manteniéndose la capacidad antioxidante del catecol.

Solo un pequeño porcentaje de los compuestos fenólicos de las plantas se encuentran en forma de fenoles sencillos, la mayoría se encuentran unidos a través de enlaces éster, éter, acetal, etc. a pequeñas moléculas orgánicas, fenoles complejos u otros componentes estructurales de las plantas (Robbins, R.J., 2003).

Compuestos fenólicos con cadenas hidrocarbonadas largas han sido identificados previamente en varias especies de plantas. En muchos casos, estos ésteres son ácidos fenilpropenoicos esterificados con alcoholes típicos de ceras, como por ejemplo los *p*-cumaratos encontrados en la planta *Rosa*

Rugosa (Hashidoko et al, 1992). Aunque también aparecen alcoholes fenólicos esterificados con ácidos de cadena larga. Jetter y colaboradores identifican numerosos ésteres de cadena larga de fenilpropil y fenilbutil alcoholes como constituyentes de resinas y ceras provenientes de distintas plantas de la familia de los tejos (taxáceas) (Jetter et al, 2002). Entre los distintas grupos que identifican se encuentra una serie constituida por trece ésteres del 3-(3,4-dihidroxifenil)-propanol con ácidos grasos desde C₁₈ a C₃₂. Algunos de estos ésteres también han sido identificados en diversas partes de otras plantas como *Symphyopappus compressus* (Bohlmann et al, 1981) y *Phonus arborescens* (Barrero et al, 1997). Ésteres fenólicos combinados con cadenas alifáticas largas han sido identificados como principal componente estructural de los biopolímeros de suberina (Kolattukudy, P.E., 1980).

Por tanto, no solo se pretende sintetizar antioxidantes lipofílicos a partir de productos naturales, sino que además algunos de los productos que se obtienen, también son naturales, con lo cual se ven reducidas las restricciones legales para la utilización de estos productos.

4.3 SÍNTESIS DE ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS.

La acilación selectiva de alcoholes primarios frente a alcoholes secundarios constituye una importante transformación frecuentemente empleada en síntesis orgánica, como se deduce del número de métodos encontrados en bibliografía. Por este motivo, creemos que es importante realizar un estudio de reactividad en distintas condiciones de acilación a fin de encontrar métodos para la funcionalización selectiva de estas moléculas.

Los alcoholes se transforman en ésteres por reacción con cloruros de ácido o anhídridos de ácido en condiciones de reacción que no se admiten para productos destinados a alimentación. Por esta razón se han desarrollado en los últimos años métodos enzimáticos, que evitan las restricciones legales para la obtención de este tipo de productos. Al ser el objetivo último de las moléculas de este trabajo su inclusión como antioxidante en un alimento, debemos desarrollar los métodos enzimáticos adecuados para su obtención.

4.3.1 Síntesis química de antioxidantes lipofílicos.

Para estudiar la regioselectividad de la reacción de acilación sobre una molécula como la del alcohol 3,4 dihidroxibencílico se realizaron distintos experimentos empleando las condiciones generales de esterificación:

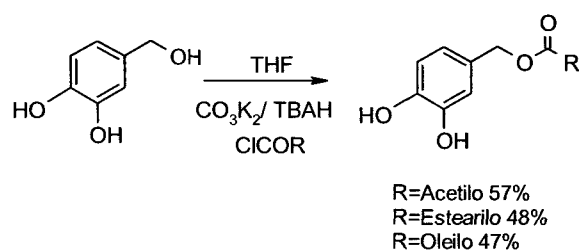
- Anhídrido oleico/ piridina.
- Cloruro de oleilo/ piridina.

Se obtuvieron como resultado mezclas complejas sin que se observara selectividad sobre alguna de las posiciones de la molécula.

Con la finalidad de encontrar un método eficaz de monoacilación selectiva sobre alguna de las posiciones de la molécula, se ensayó el empleo de catálisis de transferencia de fase para intentar introducir un grupo acetato sobre el anillo fenólico. Se ha referenciado que el empleo de catálisis de transferencia de fase ofrece cierta selectividad en la esterificación de hidroxilos fenólicos frente a alifáticos, como en el caso de la acilación del β -estradiol (Illi et al, 1979).

En una primera experiencia se adicionó sobre una suspensión de alcohol 3,4 dihidroxibencílico, carbonato potásico anhidro e hidrogeno sulfato de tetrabutilamonio en THF, una disolución de cloruro de acetilo en THF y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente y atmósfera inerte durante dos horas, la reacción se siguió por TLC hasta que no se observó más evolución. En la reacción apareció un solo producto de reacción que se aisló del alcohol 3,4 dihidroxibencílico que quedó sin reaccionar mediante cromatografía en columna.

Cuando se realizaron experiencias de RMN para determinar su estructura se comprobó, que en contra de los datos recogidos por otros autores, la reacción había tenido lugar sobre el hidroxilo primario de la molécula y no sobre el fenólico, obteniéndose el acetato del alcohol 3,4 dihidroxibencílico de forma directa en un solo paso de reacción y con un rendimiento del 60%, figura 93 . Para comprobar la eficacia de la metodología se ensayó la reacción con distintos cloruros de ácido (cloruro, estearilo, oleilo) observando igual selectividad en la reacción, obteniéndose los correspondientes derivados en posición primaria entre un 45% y un 60% de rendimiento.



-Figura 93-

Las estructuras de los nuevos compuestos sintetizados quedaron perfectamente establecidas en base a los datos de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y espectrometría de masas FAB+.

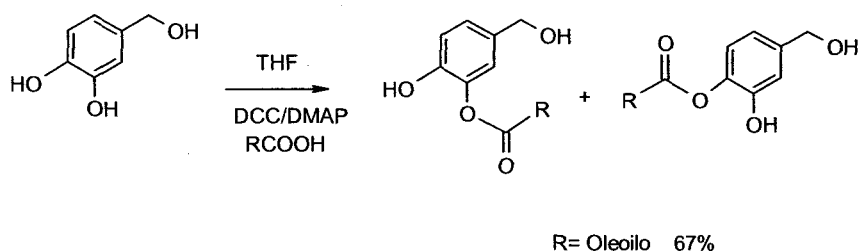
La introducción de ácidos grasos sobre el hidroxilo primario desplaza a campo bajo más de media ppm la señal del $-\text{CH}_2-$ bencílico correspondiente (4.41 ppm a 4.99 ppm), siendo el desplazamiento de esta señal la principal indicación para establecer las estructuras de los derivados monosustituídos en posición primaria.

Aparecen otras señales correspondientes al ácido graso introducido, como por ejemplo los hidrógenos vinílicos cuando se introduce ácido oleico (5.34 ppm), y en todos los casos, las señales características a $-\text{CH}_2-$ en alfa y beta de carbonilo (a 2.32 ppm y 1.61 ppm respectivamente). La evaluación de la integral de estas señales permite determinar la sustitución de la molécula (tabla 14).

	$-\text{CH}_2-\text{OR}$ (ppm)	$-\text{CH}=\text{CH}-$ (ppm)	α -Carbonilo (alifatico, ppm)	β -Carbonilo (alifatico, ppm)
Alcohol protocateico	4.41	-	-	-
MonoAcetato	4.99	-	2.09 (3H)	-
MonoEstearato (IV)	4.99	-	2.33 (2H)	1.61 (2H)
MonoOleato (V)	4.99	5.34 (2H)	2.32 (2H)	1.61 (2H)

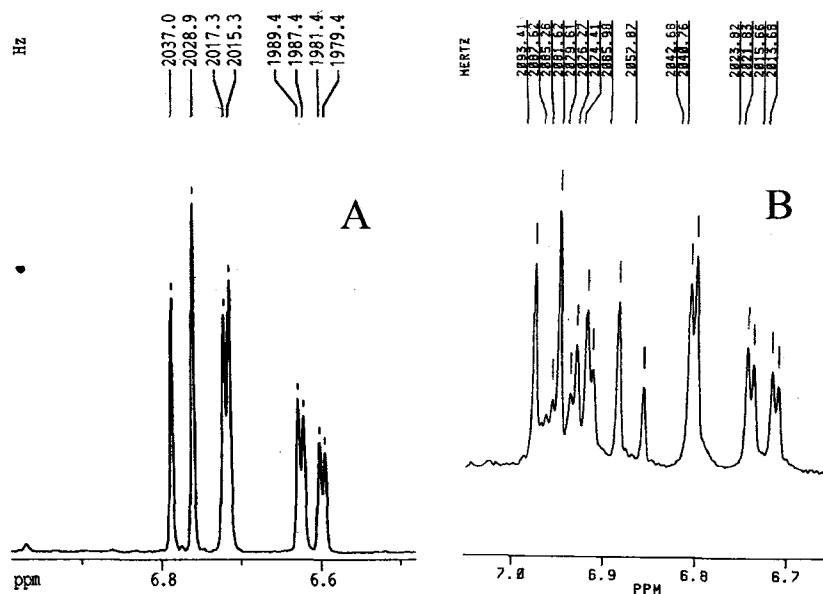
-Tabla 14-

Posteriormente, se ensayó la reacción de esterificación con activación electrofílica mediante la adición de una mezcla de un equivalente de DCC y DMAP al 10%, directamente sobre una disolución de ácido oleico y el alcohol 3,4 dihidroxibencílico en THF, se observó que el producto mayoritario resultante, se diferenciaba en R_f del producto obtenido mediante catálisis de transferencia de fase. Se procedió a su aislamiento e identificación mediante RMN viéndose a partir de sus datos espectroscópicos que la esterificación se había producido indistintamente sobre cada una de las posiciones fenólicas, figura 94.



-Figura 94-

Esto hecho se pone de manifiesto en el espectro por una complicación sustancial de las señales de los protones aromáticos de la molécula pudiéndose distinguir el juego de señales correspondientes a cada uno de los isómeros (señales B, figura 95).



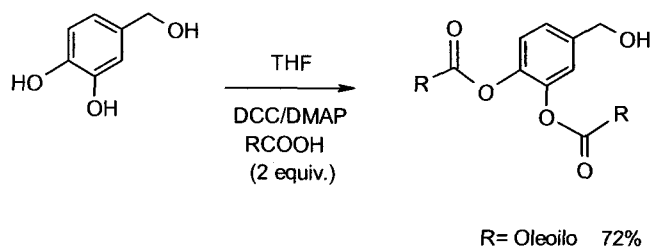
-Figura 95-

El $-\text{CH}_2-$ bencílico se mantiene en los valores correspondientes al hidroxilo libre, y las integrales resultan coherentes con una monoesterificación (tabla 15), las señales correspondientes a los protones en alfa y beta de carbonilo, sufren desplazamientos de aproximadamente 0.25 ppm a campo bajo con respecto a los valores que presentan estas mismas señales, en los compuestos unidos a través de la posición primaria (2.32 ppm y 1.61 ppm).

	$-\text{CH}_2\text{-OR}$ (ppm)	$-\text{CH}=\text{CH}-$ (ppm)	α -Carbonilo (Aromatico, ppm)	β -Carbonilo (Aromatico, ppm)
Alcohol protocateico	4.41	-	-	-
MonoOleato	4.40	5.34 (2H)	2.56 (2H)	1.75 (2H)

-Tabla 15 -

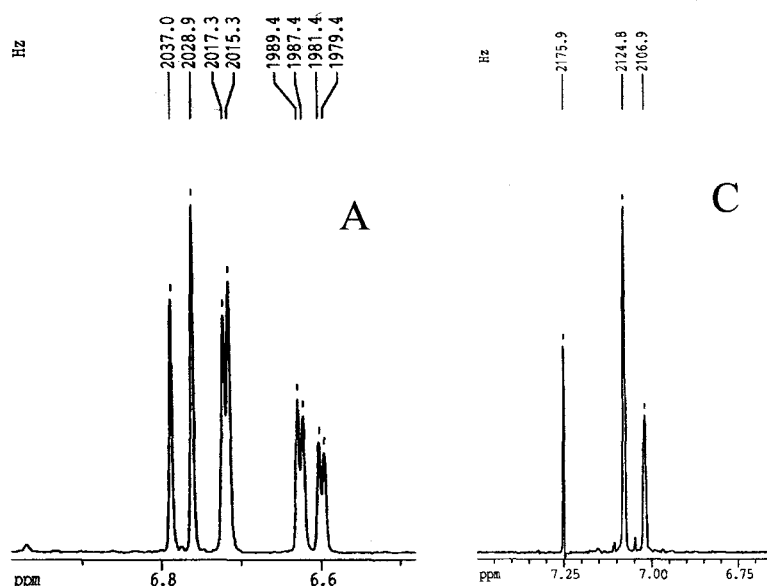
Cuando seguimos esta misma metodología pero con dos equivalentes de DCC y dos equivalentes de ácido oleico, se obtiene el correspondiente derivado disustituido en posición fenólica, figura 96.



-Figura 96-

Las estructuras, como en casos anteriores, se han determinado en base a los datos de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y espectrometría de masas FAB+.

Los espectros de ^1H -RMN de estos compuestos presentan la siguiente peculiaridad; como consecuencia de la introducción de un grupo carbonilo cuando se esterifican los dos hidroxilos fenólicos, el juego de señales característico de los protones aromáticos del alcohol 3,4 dihidroxibencílico, cambia drásticamente, figura 97.



-Figura 97-

Los protones aromáticos de la molécula de alcohol 3,4 dihidroxibencílico aparecen en el espectro como sistemas AB ya que las constantes de

acoplamiento son de similar magnitud que las diferencias de desplazamiento químico de los núcleos que se acoplan, debido a esto aparecen mostrando conocido efecto "tejado" donde las señales externas se encuentran atenuadas y las internas aumentadas (figura 97). Cuando se produce la esterificación de ambos hidroxilos fenólicos, estas diferencias son prácticamente insignificantes y se colapsan las señales de los distintos protones, apareciendo el espectro como dos singletes, uno a campo bajo, que integra por dos protones y otro ligeramente más apantallado que integra por un protón.

Una inspección detallada de estas señales muestra la presencia de picos de muy baja intensidad acompañando al primer singlete, y la aparición de hombros en los picos sobre los picos, que apoyan la hipótesis del colapso de las señales aromáticas.

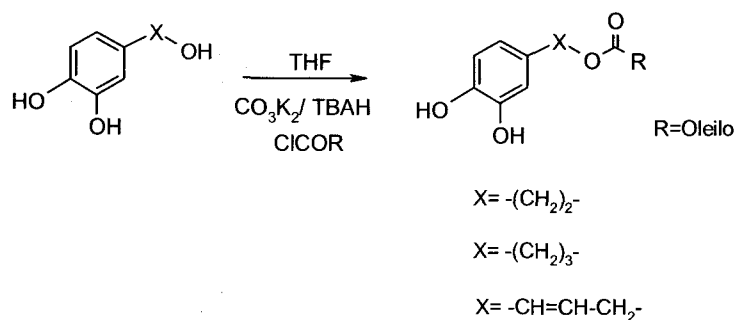
El resto de señales del espectro son coherentes con las estructuras propuestas apareciendo las señales tanto del alcohol 3,4 dihidroxibencílico como del ácido graso en sus desplazamientos químicos habituales. Las integrales igualmente siguen una perfecta concordancia con la disustitución (tabla 16).

	-CH₂-OR (ppm)	-CH=CH- (ppm)	α-Carbonilo (Aromatico, ppm)	β-Carbonilo (Aromatico, ppm)
Alcohol protocateico	3.60	-	-	-
DiOleato (XI)	3.84	5.34 (4H)	2.51 (4H)	1.72 (4H)

-Tabla 16-

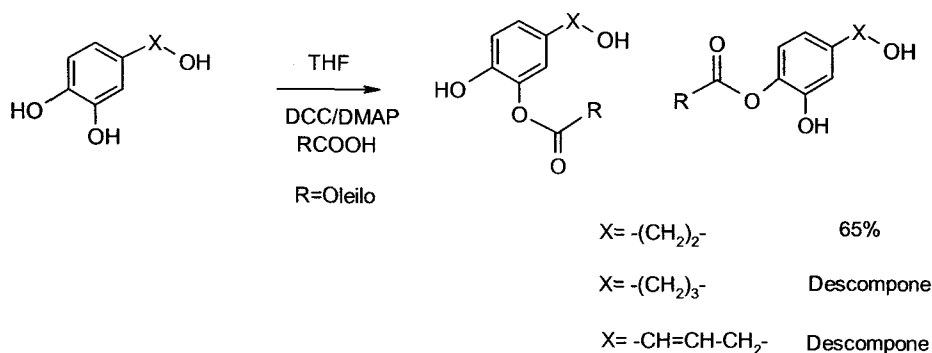
Por tanto, disponemos de dos métodos sencillos para esterificar selectivamente cualquiera de las posiciones de la molécula.

En extensión, la esterificación en condiciones de catálisis de transferencia de fase sobre los alcoholes X-XII condujo a la obtención de los correspondientes oleatos sobre la posición primaria con buenos rendimientos, figura 98.



-Figura 98-

En cambio la síntesis de derivados monosustituídos sobre la posición fenólica con activación electrofílica no mostró tan buenos resultados. Se consiguió de forma eficaz para los alcoholes IX^{*} y X aislándose los correspondientes derivados con buenos rendimientos, pero cuando se abordó la síntesis con los alcoholes XI y XII los productos descompusieron en la columna, obteniéndose el alcohol libre y el ácido graso en cada caso, figura 99.



-Figura 99-

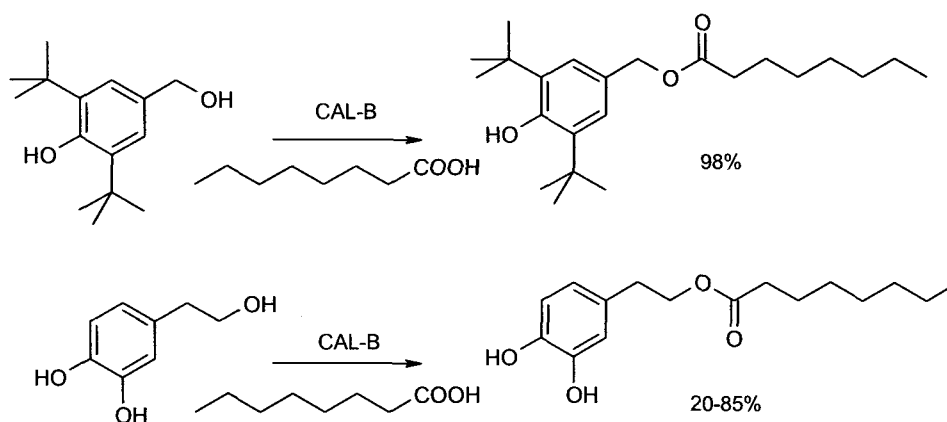
Las estructuras de los nuevos derivados han sido igualmente establecidas en base a los datos de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y espectrometría de masas FAB+.

4.3.2 Síntesis enzimática de antioxidantes lipofílicos.

La síntesis enzimática presenta múltiples ventajas por su selectividad, su carácter medioambiental y su aplicación en la industria alimentaria. Los métodos enzimáticos son muy variados, se aplican sobre muchos tipos de sustratos y con variadas condiciones de reacción. Se encuentran recogidos en la bibliografía diversos antecedentes al respecto que comentaremos brevemente.

Kolisis y colaboradores realizan la esterificación de los flavonoides rutina y naringina con ácidos grasos de cadena media para modificar su solubilidad en medios grasos (Kolisis et al, 2003).

Guyot y colaboradores recogieron por primera vez la síntesis enzimática de ácidos fenólicos con alcoholes de cadena larga (Guyot et al, 1997). Buisman y colaboradores extienden el estudio con ácidos cinámicos y benzoicos junto a alcoholes entre 4 y 12 carbonos pero debido a la baja especificidad de sustrato, recomiendan una aproximación del tipo alcohol fenólico esterificado junto a un ácido alifático como estrategia para sintetizar antioxidantes lipofílicos. En el estudio indican que la lipasa *Candida antarctica* ha sido, entre otras siete enzimas, la de mayor actividad catalítica en la esterificación de fenoles con grupos hidroxilo primarios y ácidos grasos alifáticos para sintetizar antioxidantes lipofílicos. Como ejemplos recoge la síntesis del éster caproico (C8) del hidroxitirosol y del alcohol 3,5 di-t-butil-4-hidroxi bencilo, figura 100.



-Figura 100-

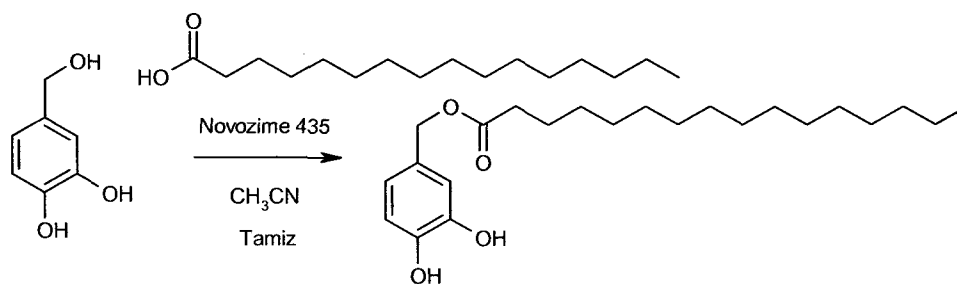
Los mejores rendimientos se obtienen con un equivalente de ácido octanoico, en hexano, a 50°C durante 20 horas. Sin embargo, cuando la reacción la llevan a cabo en disolventes más polares (diclorometano, THF) los rendimientos bajan al 20%. (Buisman et al, 1998).

Por tanto, se decidió abordar la síntesis de antioxidantes lipofílicos derivados de alcoholes fenólicos con distintos ácidos grasos empleando la fracción B de la lipasa *Candida antarctica* (Novozyme 435).

Para estudiar las condiciones más favorables para la esterificación enzimática de los alcoholes IX-XII empleando Novozyme 435, se realizaron distintos ensayos preliminares de esterificación del alcohol 3,4 dihidroxibencílico con ácido palmítico, variando distintas condiciones experimentales.

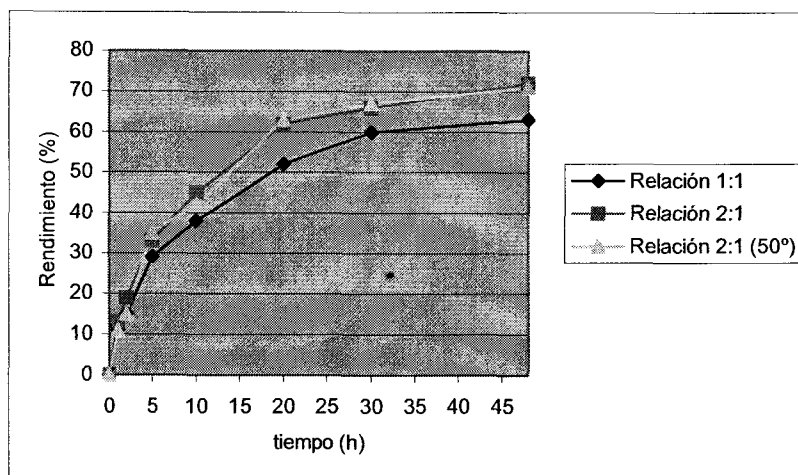
Una estrategia generalmente empleada en síntesis enzimática consiste en la eliminación del medio de la reacción del agua o alcoholes volátiles formados como subproductos de la utilización de ácidos o ésteres como agentes acilantes respectivamente, empleándose para ello tamices moleculares o presión reducida. El uso de ésteres vinílicos como agentes acilantes también se emplea con frecuencia (Hult et al, 2003).

La reacción con ácido palmítico como agente acilante se realizó a 37°C y 50°C con relaciones molares de ácido respecto al alcohol de 1:1 y 2:1, en acetonitrilo y empleando tamiz molecular para eliminar el agua del sistema. La reacción se inició con la adición de la enzima Novozyme 435 y se mantuvo en agitación vigorosa bajo atmósfera de argón durante varios días, figura 101.



-Figura 101-

En base a datos obtenidos mediante HPLC a distintos tiempos de reacción, los mejores rendimientos (73%) se obtuvieron con una relación molar 2:1. No se observaron incrementos considerables en el rendimiento de la reacción después de 24 horas, considerándose que en ese tiempo la reacción alcanzó el estado estacionario, figura 102. Los rendimientos cuando se realizó la reacción a 50°C fueron similares a los obtenidos a menor temperatura, por lo que se prefirió trabajar a 37°C para evitar posibles oxidaciones de los productos.



-Figura 102-

El seguimiento de las reacciones enzimáticas se ha realizado mediante HPLC empleando una columna Symmetry C18, 4.0 X 250 mm, de 5 μ m con una fase móvil binaria constituida por acetonitrilo y ácido acético al 1%. La detección de los compuestos se ha realizado con un detector PDA a 280 nm de longitud de onda.

Se realizaron varias pruebas para determinar qué composición y gradiente que proporciona mejor resolución de los picos de interés empleándose finalmente la siguiente composición para la fase móvil (tabla 17).

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% Disolvente A: <i>Acetonitrilo</i>	% Disolvente B: <i>Ac.Acético 1%</i>
0	1	92	8
4	1	92	8
10	1	100	0
18	1	100	0
20	1	92	8
25	1	92	8

-Tabla 17-

La purificación cromatográfica final en columna resultó tediosa debido a la proximidad en R_f del ácido palmítico en exceso y del producto de esterificación. Hubo que recurrir a columnas cromatográficas con fases móviles

muy apolares, para la obtención de los ésteres, no del todo libres de ácido, unido al considerable gasto de tiempo y de reactivos que implica.

Se probó a lavar con hexano el crudo de la reacción diluido en acetonitrilo, pero no resultó del todo eficaz para eliminar el exceso de ácido.

Sin embargo, un procedimiento que resultó eficaz para la purificación del éster palmítico, fue el empleo de la extracción en fase sólida y posterior percolación en columna cromatográfica.

La extracción en fase sólida es una poderosa técnica de preparación de muestras que en los últimos años ha cobrado especial relevancia en todas las aplicaciones cromatográficas. Los campos en donde ha experimentado un mayor avance es en el análisis de contaminantes, control de calidad de alimentos, así como en aplicaciones farmacéuticas.

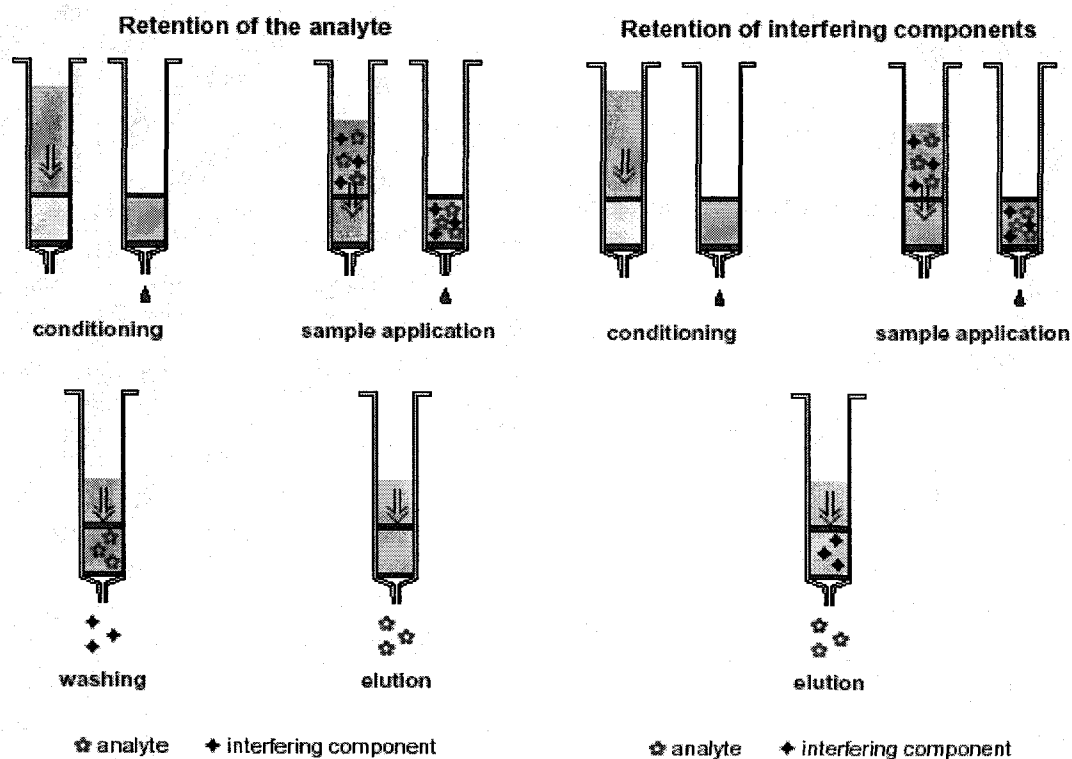
Las principales ventajas que presenta la extracción en fase sólida frente a los procedimientos de extracción líquido-líquido convencionales son:

- Un menor gasto de disolventes orgánicos durante el proceso.
- Pre-concentración de los analitos en la muestra.
- Eliminación del efecto matriz.
- Rapidez, bajo costo y facilidad para su automatización.

En el procedimiento de separación mediante cartuchos de SPE, la muestra se hace pasar a través de la columna de extracción, quedando los analitos retenidos selectivamente en el relleno. Una elección adecuada de los disolventes de lavado, permite la eliminación de las impurezas de la muestra. Finalmente, mediante un disolvente de elución, los analitos se recuperan selectivamente de la columna, resultando un concentrado altamente purificado de la muestra. Alternativamente, una columna puede retener selectivamente las interferencias, permitiendo la elución de los analitos, resultando igualmente una purificación de la muestra, figura 103.

Existen numerosos tipos de relleno para cartuchos de SPE, suelen ser soportes de gel sílice o de base polimérica, con restos de diversa naturaleza que les confieren propiedades selectivas de adsorción, por ejemplo la retención selectiva que tienen los rellenos de gel de sílice con cadenas de diol en la retención selectiva de catecoles (Cert et al, 2001).

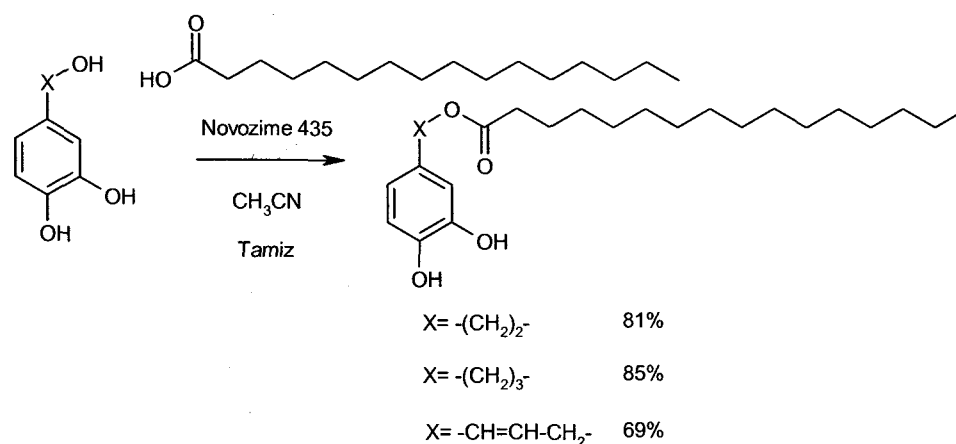
El protocolo comienza con el preacondicionamiento del cartucho pasando sucesivamente metanol y hexano. Después de introducir el crudo de reacción, se lava con distintos volúmenes de hexano, que elimina el exceso de ácido no retenido. La elución del éster se realiza pasando metanol que se concentra y posteriormente se percola sobre un poco de gel de sílice empleando como fase móvil una mezcla de hexano éter 1:1. El compuesto se obtiene libre de ácido con un rendimiento del 75% en las mejores condiciones de reacción ensayadas.



-Figura 103-

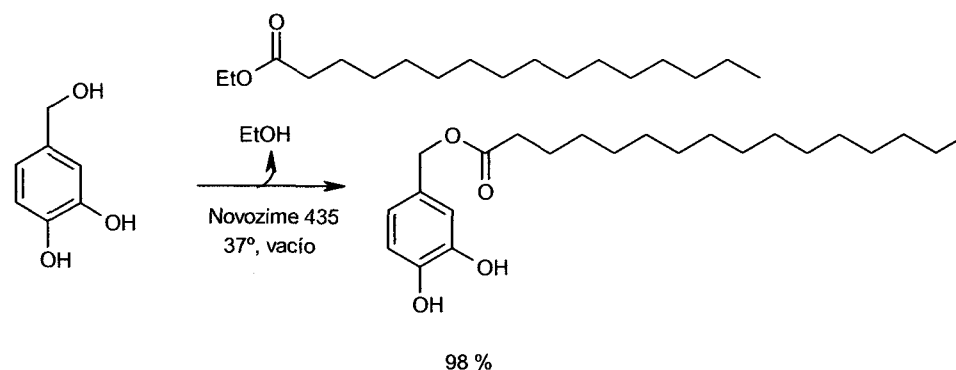
La metodología anterior se extendió a la síntesis de los correspondientes ésteres palmíticos de los alcoholes X-XII, encontrando ligeros incrementos en los rendimientos conforme aumenta la longitud de la cadena alifática del alcohol, figura 104.

Las estructuras de los nuevos derivados han sido establecidas en base a los datos de $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$ y espectrometría de masas FAB+.



-Figura 104-

Para ver como afecta la naturaleza del agente acilante, se probó a realizar la reacción con palmitato de etilo en considerable exceso respecto al alcohol 3,4 dihidroxibencílico y sin emplear acetonitrilo como disolvente. Para favorecer el desplazamiento de la reacción hacia la formación del éster, se aplicó presión reducida conectando el sistema a una bomba de vacío. Los resultados mostraron un considerable incremento en la velocidad de la reacción, alcanzándose conversiones de prácticamente el 100% a las pocas horas de comenzar la reacción, figura 105.

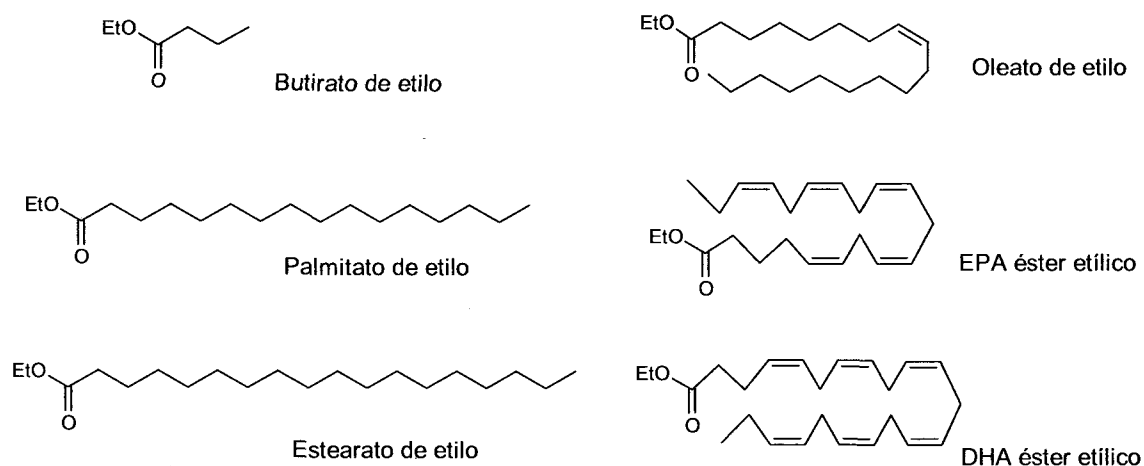


-Figura 105-

El procesado de la reacción se realizó disolviendo el crudo de reacción en acetonitrilo y lavando varias veces con hexano. Después de tres lavados, se consigue la eliminación casi completa del exceso de palmitato de etilo de la reacción, obteniéndose el correspondiente derivado esterificado después de una sencilla percolación cromatográfica.

Por lo tanto, disponemos de un método enzimático eficaz y sencillo para sintetizar ésteres de fenoles con ácidos grasos para y obtener antioxidantes lipofílicos. Uno de nuestros objetivos es aplicar esta metodología para obtener una amplia gama de derivados donde la diferencia principal sea la naturaleza del ácido graso. Esto hecho nos proporciona distintas propiedades de las moléculas para ampliar su abanico de aplicaciones.

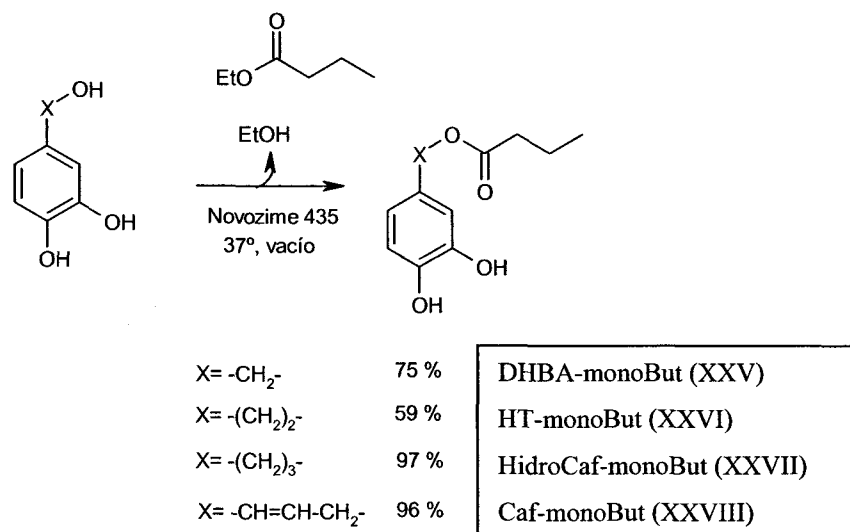
Se han elegido distintos tipos de ésteres etílicos de ácidos grasos para esterificar los alcoholes IX-XII. Los compuestos elegidos, todos ellos disponibles comercialmente, son (figura 106):



-Figura 106-

4.3.2.1 Síntesis enzimática de ésteres butíricos.

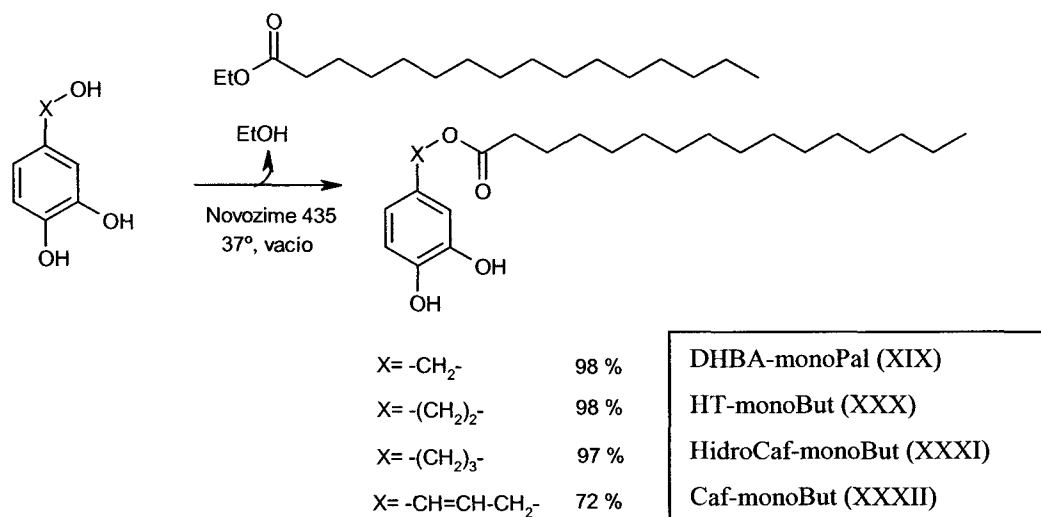
La reacción de transesterificación empleando Novozime 435 de los alcoholes IX-XII con butirato de etilo se realizó a 37 °C en ausencia de disolvente, con un exceso de agente acilante y con el matraz de reacción abierto a la atmosfera durante 15 horas, figura 107. La eliminación del exceso de butirato de etilo se realizó en una bomba de vacío, después filtrar y lavar con salmuera el crudo de reacción disuelto en diclorometano, secar y concentrar en el rotavapor. Los correspondientes ésteres se obtuvieron sin necesidad de más etapas de purificación adicionales con altos rendimientos.



-Figura 107-

4.3.2.2 Síntesis enzimática de ésteres palmíticos.

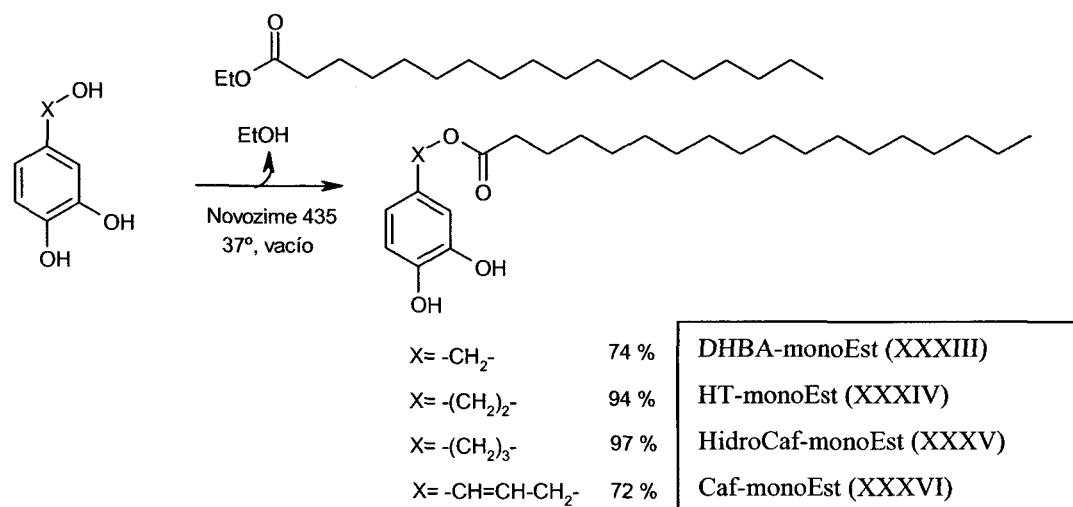
La reacción de transesterificación empleando Novozime 435 de los alcoholes IX-XII con palmitato de etilo se realizó a 37 °C en ausencia de disolvente, con un exceso de agente acilante y con el matraz de reacción conectado a un sistema de vacío durante 16 horas, figura 108. El crudo de reacción disolvió en acetonitrilo, se filtró y se lavó varias veces con hexano para eliminar el exceso de palmitato de etilo. Los crudos de reacción se percolaron sobre gel de sílice obteniéndose los correspondientes ésteres palmíticos con altos rendimientos.



-Figura 108-

4.3.2.3 Síntesis enzimática de ésteres esteáricos.

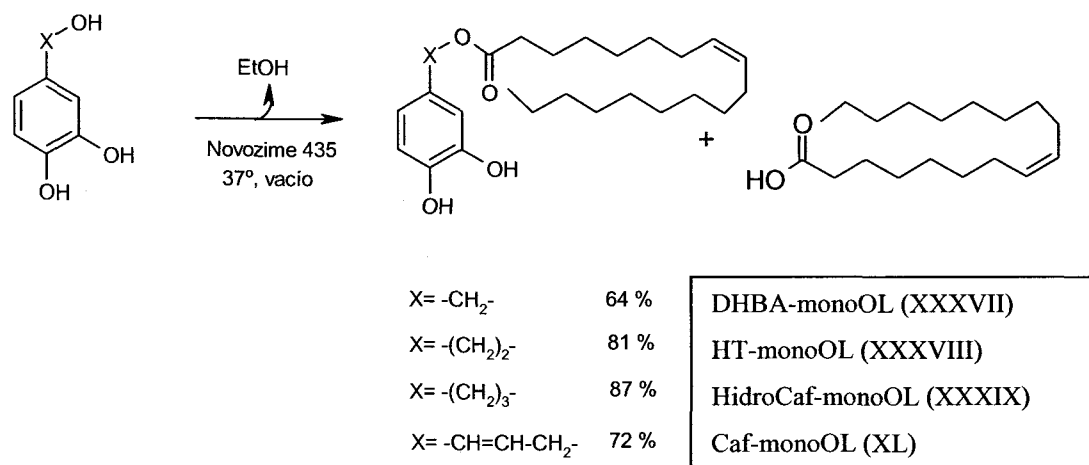
De forma análoga se realizó la síntesis de los estearatos de los alcoholes IX-XII mediante transesterificación empleando Novozime 435 con estearato de etilo a 37 °C en ausencia de disolvente, con exceso de agente acilante y con el matraz de reacción conectado a un sistema de vacío durante 16 horas, figura 109. Igualmente, el crudo de reacción disuelto en acetonitrilo, se filtró y se lavó varias veces con hexano para eliminar el exceso de estearato de etilo. Los crudos de reacción se percolaron sobre gel de sílice obteniéndose los correspondientes estearil ésteres con altos rendimientos.



-Figura 109-

4.3.2.4 Síntesis enzimática de ésteres oleicos.

La síntesis de los oleatos de los alcoholes IX-XII se realizó a 37 °C empleando Novozime 435 en exceso de oleato de etilo y con aplicación de vacío en el sistema. En estas condiciones se produce además de la transesterificación, hidrólisis parcial del agente acilante apareciendo ácido oleico libre en el medio, figura 110. El empleo de agentes acilantes con insaturaciones en la cadena grasa los hace susceptibles a hidrólisis por la lipasa, lo cual no ocurre los sustratos saturados de las anteriores reacciones. Este hecho se ha comprobado posteriormente, e incluso en mayor extensión, conforme aumentan el número de insaturaciones de la cadena como en el caso de los ésteres etílicos del EPA y DHA.



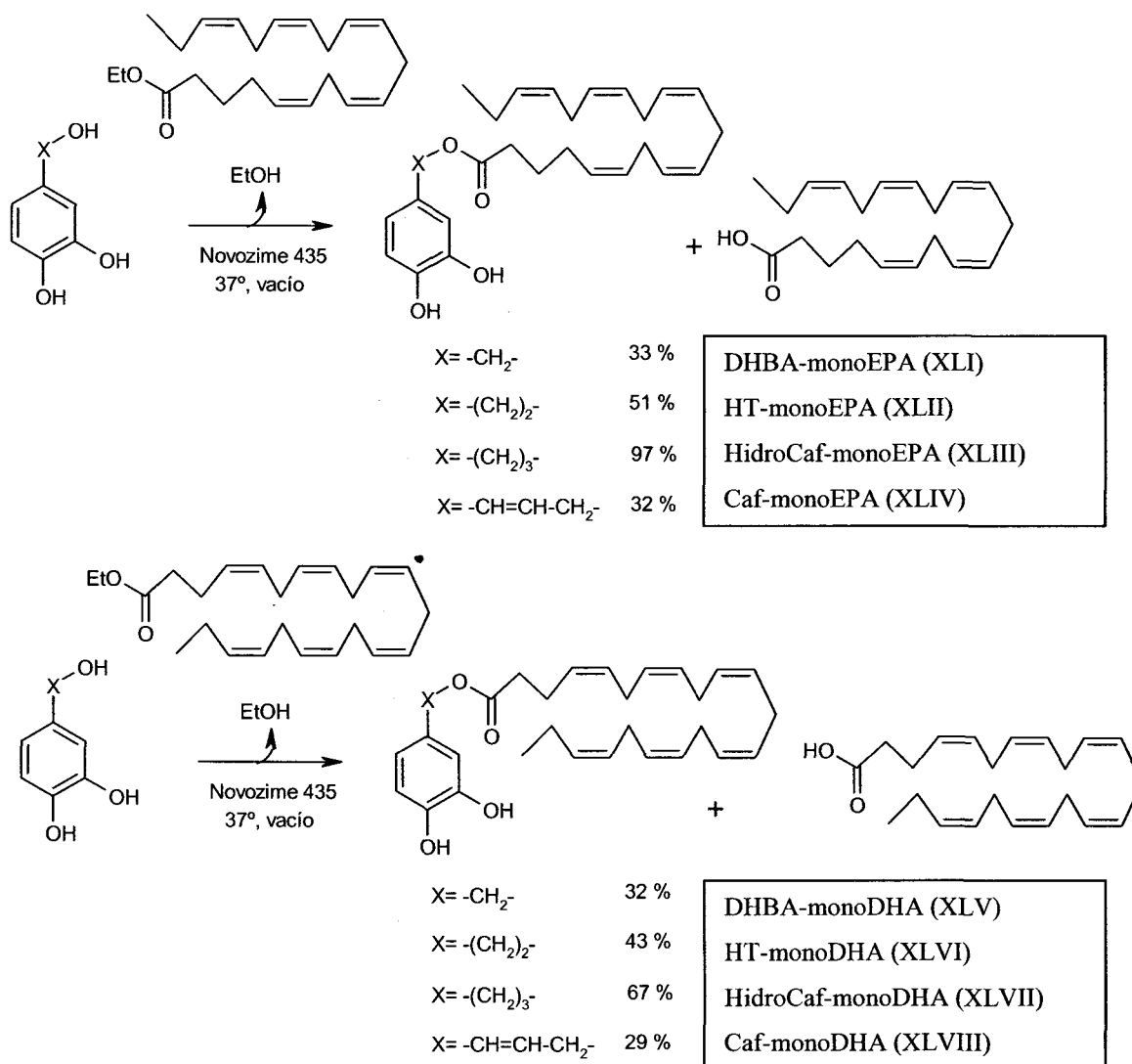
-Figura 110-

Para evitar en la medida de lo posible la hidrólisis del oleato de etilo, se redujo el tiempo de reacción a 6 horas. La reacción se diluyó en acetonitrilo, se filtró y se lavó varias veces con hexano. La purificación cromatográfica se realizó con fases móviles algo más apolares que en casos anteriores, siendo igualmente efectiva para la obtención de los correspondientes oleatos con altos rendimientos.

4.3.2.5 Síntesis enzimática de ésteres poliinsaturados EPA y DHA.

La síntesis de ésteres con ácidos grasos poliinsaturados EPA y DHA de los alcoholes IX-XII se realizó a 37 °C empleando Novozyme 435 sobre los ésteres etílicos de EPA y DHA como disolvente en 4 horas de reacción con aceptables rendimientos, figura 111.

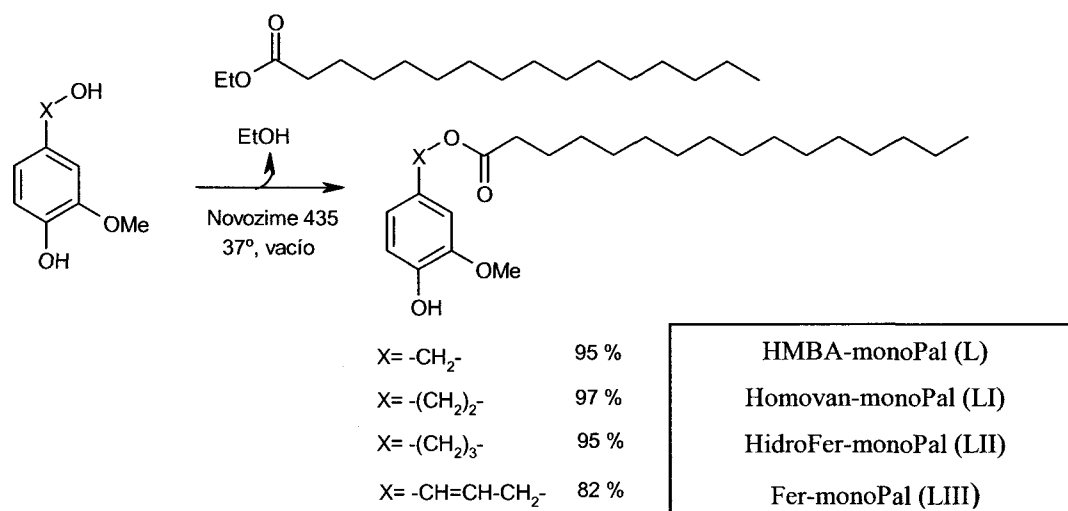
La reacción de hidrólisis del agente acilante es considerable obteniéndose el ácido libre casi a igual velocidad que el producto de transesterificación. El procesado de las reacciones se realizó disolviendo el crudo en acetonitrilo, se filtró y se lavó varias veces con poco volumen de hexano. El crudo resultante se purificó en columna cromatográfica con una fase móvil apolar para conseguir separar los productos esterificados de los ácidos EPA y DHA libres.



-Figura 111-

4.3.2.5 Síntesis enzimática de ésteres palmíticos de 4-hidroxi, 3-metoxifenil alcoholes.

La síntesis de los derivados esterificados con ácido palmítico de los alcoholes XIII-XVI se ha realizado de forma análoga a los palmitatos de los alcoholes IX-XII empleando novozyme 435, palmitato de etilo en exceso a 37 °C y con vacío. El procesado igualmente sencillo condujo a la obtención de los correspondientes ésteres palmíticos con excelentes rendimientos, figura 112.



-Figura 112-

Comentar solamente de pasada, que la mayoría de los ésteres sintetizados, excepto los butiratos, por supuesto, presentan un olor agradable. Muchos de ellos huelen a fresa o desprenden aromas que recuerdan a la vainilla y al clavo.

4.4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS NUEVOS DERIVADOS LIPOFÍLICOS.

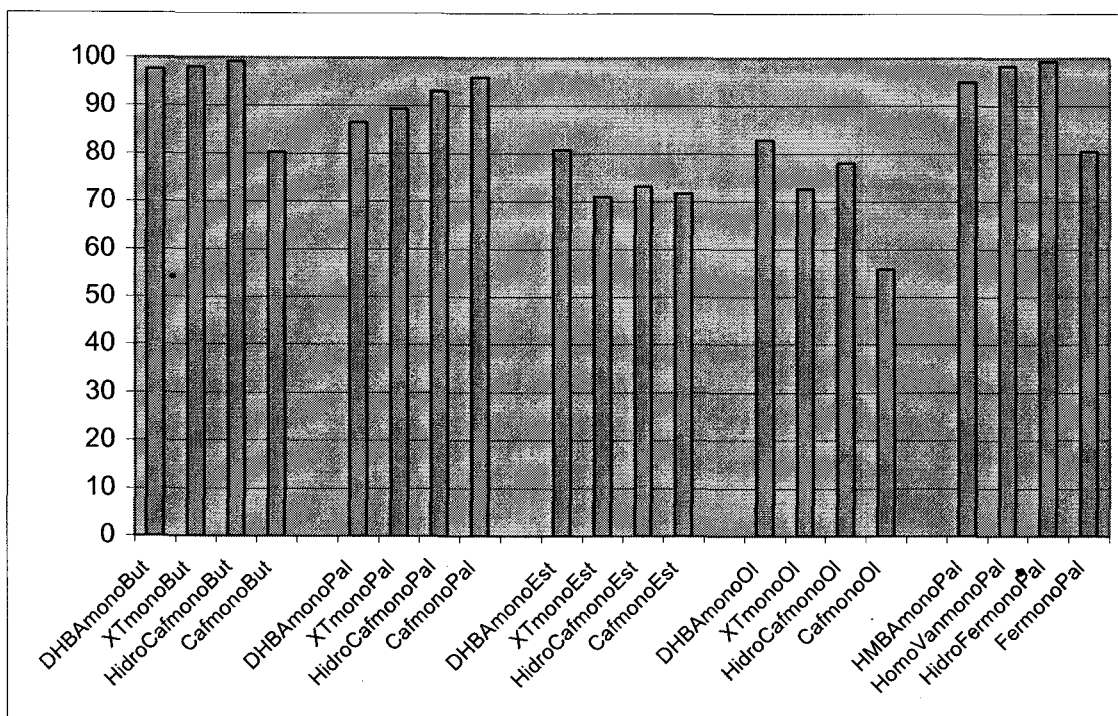
Hemos elegido como métodos para determinar la actividad antioxidante de las nuevas moléculas la determinación de su capacidad para inhibir la formación de radicales libres por el método del ABTS, indicado para determinación actividad antioxidante de moléculas lipofílicas, su capacidad para inhibir la reacción de peroxidación lipídica mediante rancimat y la utilidad para la estabilización de emulsiones de los derivados metilados mediante el método del oxígeno activo. Además se aportan los datos de lipofilia de cada molécula mediante la determinación de su coeficiente de partición. En base a estos datos se discuten los criterios estructurales que rigen el comportamiento antioxidante de estas moléculas.

4.4.1 Determinación de la capacidad de captación de radicales libres por el método del ABTS.

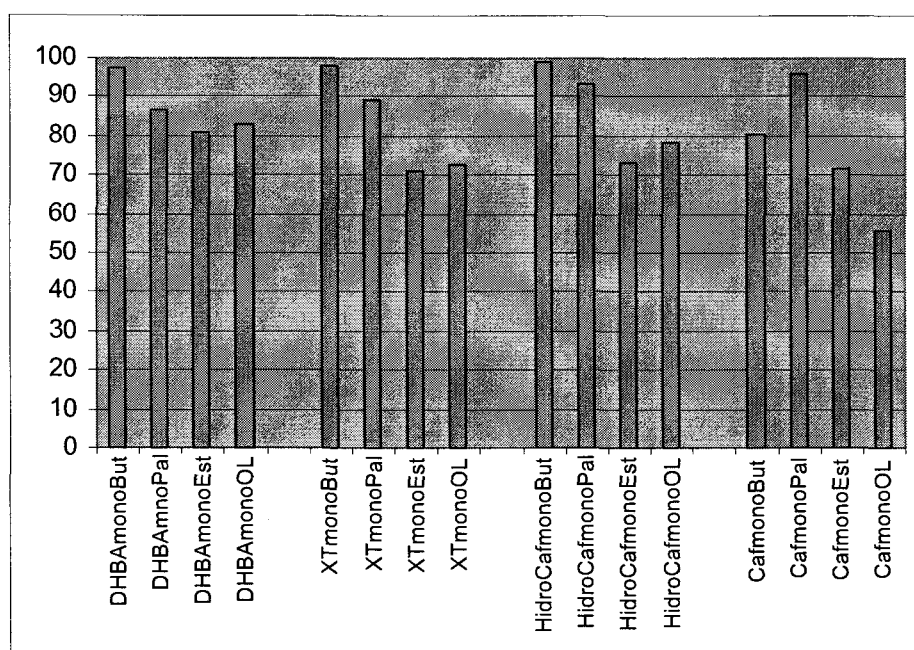
Para determinar la capacidad de captación de radicales libres mediante el método del radical ABTS, se siguió el procedimiento descrito por Pellegrini y colaboradores (Pellegrini et al, 1999).

La preparación del radical se realizó haciendo reaccionar ABTS con persulfato potásico durante 16 horas, obteniéndose por dilución, una disolución con una concentración de aproximadamente 78 μM en el radical ABTS. Las muestras de antioxidantes se prepararon en un rango de concentración de 0.5 μM a 10 μM , se añadió el radical y se mantuvo la reacción de inhibición radicalaria durante 10 minutos en oscuridad. Posteriormente se midió la reducción en la absorbancia a 734 nm comparada con un control sin antioxidante. De la representación gráfica de los resultados se obtiene el valor de EC_{50} y el valor de inhibición de producción de radicales libres para cada una de las muestras a la concentración de 10 μM en antioxidante. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, comparándose los resultados con los de antioxidantes comerciales habitualmente empleados en alimentación.

En las figuras 113 y 114 se representan los porcentajes de inhibición de cada una de las series de compuestos consideradas.



-Figura 113-



-Figura 114-

Los datos de inhibición del radical ABTS muestran un ligero incremento en la actividad antioxidante conforme aumenta la longitud de la cadena alifática del alcohol. En general, la presencia de un doble enlace en el esqueleto cinamílico, hace disminuir esta actividad.

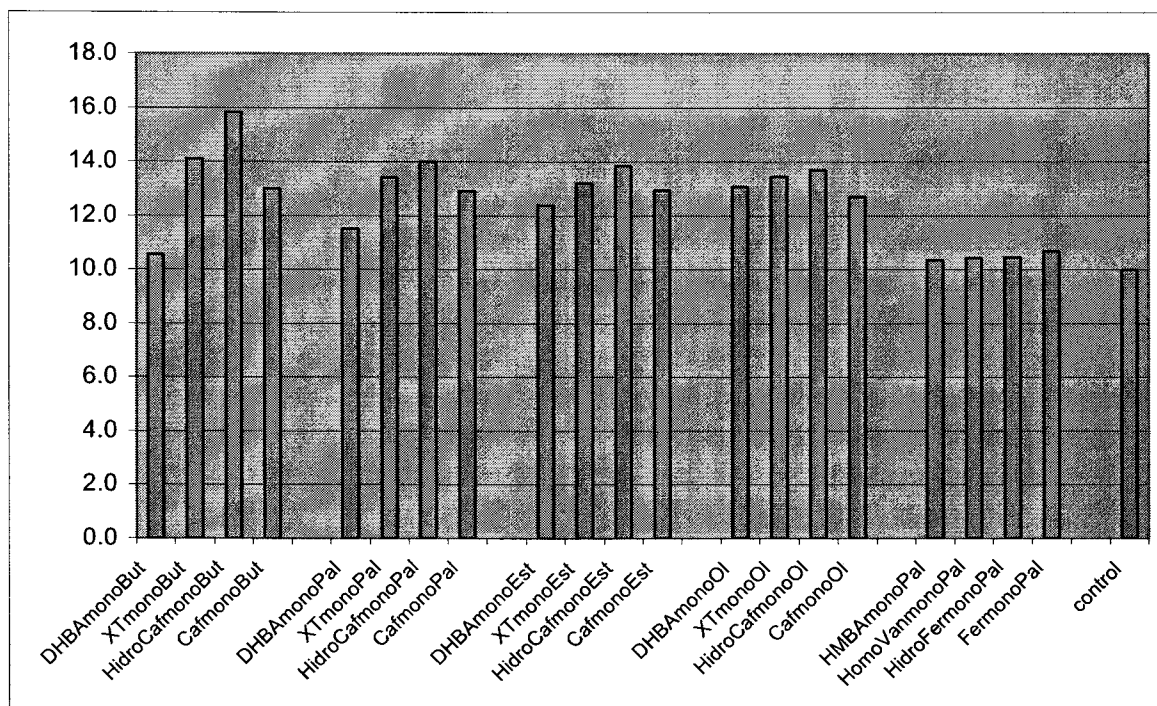
Cuando se representan los datos en función de la naturaleza de la cadena del ácido graso, se observa una disminución en la actividad conforme aumenta su longitud, para dos ácidos grasos de igual tamaño, la presencia de un doble enlace aumenta ligeramente la actividad.

Los ésteres de los alcoholes XIII-XVI muestran mejor actividad que los correspondientes derivados con la posición tres libre, probablemente por la participación del grupo metoxi en la deslocalización electrónica.

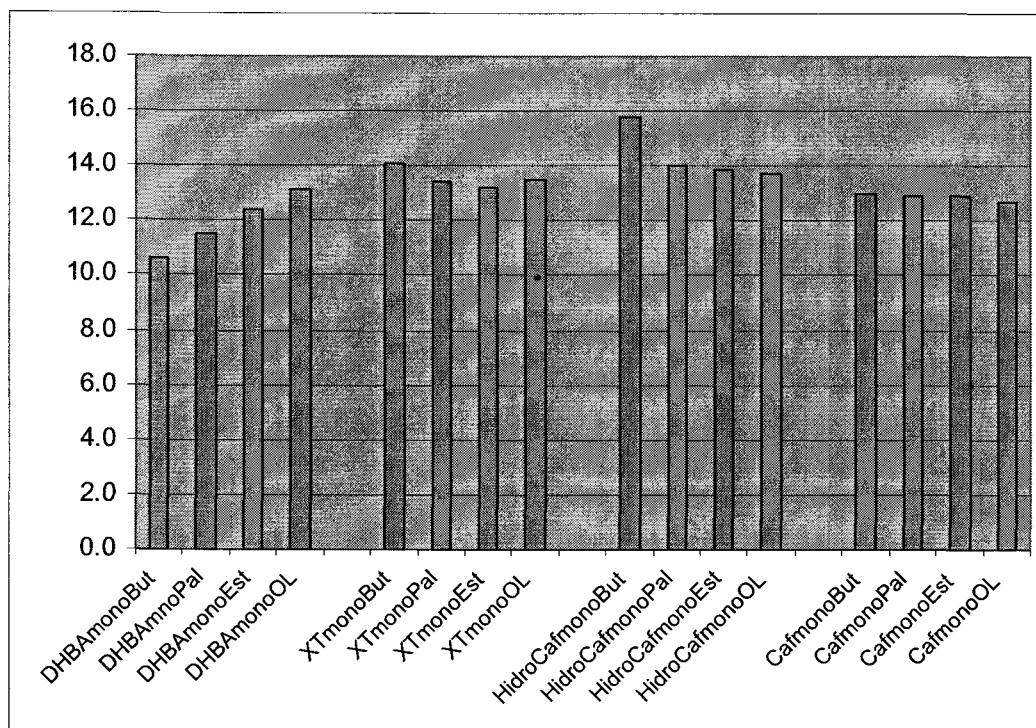
4.4.2 Determinación de la actividad antioxidante de los nuevos compuestos en aceites vegetales mediante rancimat.

La determinación de la estabilidad a la oxidación que proporcionan al aceite los nuevos antioxidantes sintetizados se realizó preparando disoluciones de 100 ppm de cada uno de las moléculas en aceite de oliva y sometiénolas a oxidación forzada al rancimat, de forma similar a como se realizó con los alcoholes fenólicos libres.

En las figuras 115 y 116 se representan los periodos de inducción en horas de cada una de las familias de derivados y comparadas con los valores de PI de varios antioxidantes comerciales. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.



-Figura 115-



-Figura 116-

El efecto que realmente se observa en la estabilización de aceites crudos es una mayor ganancia en la estabilidad del aceite conforme aumenta la longitud del alcohol, la presencia de doble enlace contribuye negativamente pero en menor extensión a como afecta su longitud, figura 116.

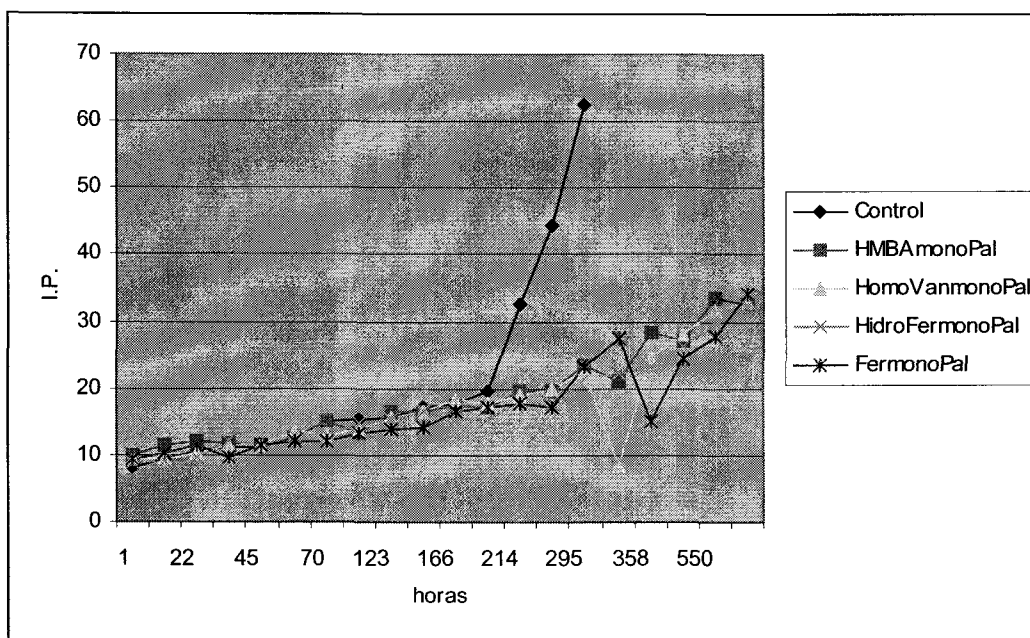
Si comparamos el efecto que tiene la naturaleza del ácido graso sobre una misma molécula en la estabilización del aceite, vemos que existen varios comportamientos. Con los ésteres del alcohol 3,4 dihidroxibencílico aumentan la estabilidad del aceite conforme aumenta la longitud del ácido graso, mientras que las otras series muestran una tendencia ligeramente descendente.

Si comparamos los datos de ABTS con los de Rancimat, vemos que en la serie de los ésteres bencílicos, pérdidas en la inhibición del radical se corresponden con ganancias en la estabilidad de los aceites. Esta serie constituye además una excepción a la paradoja polar ya que los compuestos más apolares son los antioxidantes más activos en el aceite. Se ver por tanto que hay factores adicionales que estén tomando parte en la actividad antioxidante y que no se han tenido en cuenta, como podría ser la formación de productos de degradación con actividad antioxidante o prooxidante.

Para el resto de las series en general si se correlacionan bien los datos de ABTS con la estabilidad al rancimat y con lo predicho por la paradoja polar.

4.4.3 Determinación de la actividad antioxidante en emulsión.

Para demostrar la efectividad en la estabilización de emulsiones de los derivados con la posición tres metilada frente a los correspondientes ésteres con el catecol libre, se prepararon emulsiones al 30% en agua de cada uno de los compuestos a ensayar a partir de las disoluciones en aceite de oliva de 100 ppm y se introdujeron en un incubador con agitación orbital a 45°C. Se sacaron alícuotas diarias y se determinó su contenido en peróxidos lipídicos mediante el método oficial de determinación de este parámetro. Los resultados muestran una mayor estabilización de las emulsiones con los antioxidantes con la posición tres metilada más apolares, figura 117.

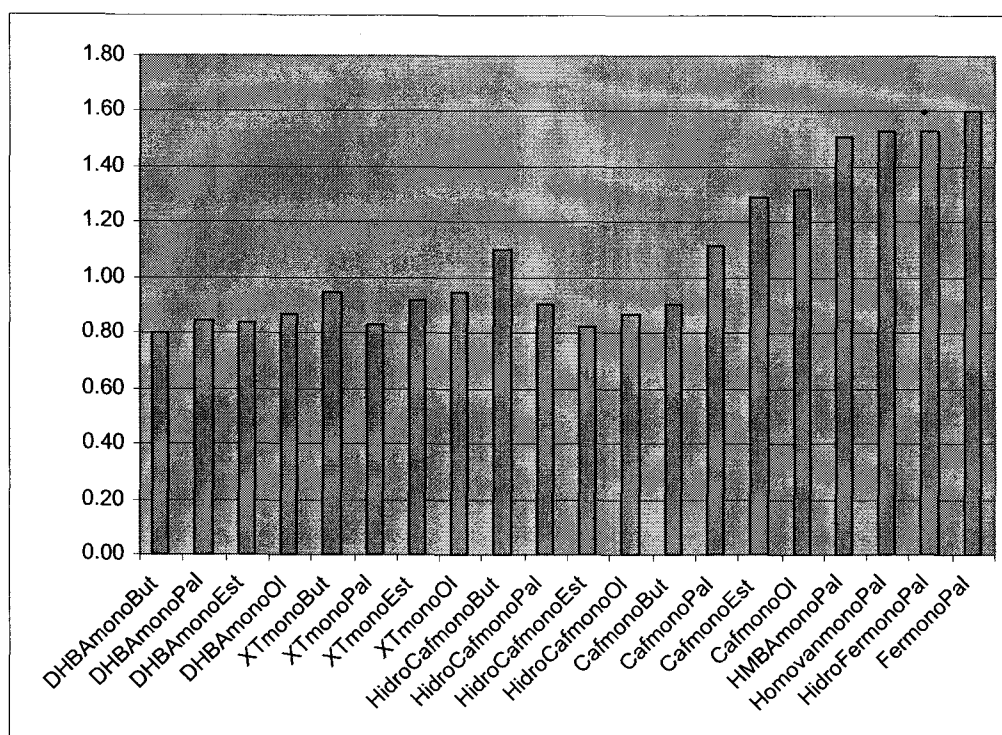


-Figura 117-

4.4.4 Derminación del logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua de los nuevos derivados.

La medida del coeficiente de partición se realizó en una mezcla 1-octanol/ agua (1:1 vol:vol) a una concentración de 0.3 mM de cada uno de los antioxidantes en la fase orgánica. Se determinó el máximo de absorción de cada uno de los compuestos en n-butanol y se midió el descenso de que se produce en la absorbancia cuando se realiza el reparto con una fase acuosa.

En la figura 118 se representa el logaritmo del coeficiente de partición para cada uno de los antioxidantes sintetizados. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.



-Figura 118-

Otras discrepancias que se encuentran entre datos de ABTS y estabilidad al rancimat de algunos compuestos se explican comparando los valores de log (P) y en cualquier caso, la molécula más polar es la que efectivamente estabiliza en mayor medida el aceite.

4.5 CÁLCULOS TEÓRICOS PARA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

Hemos visto que existen distintos métodos experimentales para determinar la capacidad antioxidante de compuestos orgánicos; experimentos basados en captación de radicales libres (DPPH, ABTS), test acelerados de oxidación en aceites crudos y emulsiones (rancimat, horno) que nos dan idea del comportamiento real de las moléculas en el alimento.

En los últimos años ha aumentado el interés de los científicos en los estudios de relaciones actividad-estructura empleando métodos teóricos para elucidar o predecir diferencias en la actividad de series de varias moléculas (Bakalbassis et al 2001).

Los métodos teóricos se basan en el hecho de considerar que el principal mecanismo de control de la reacción de oxidación en cadena es la captura del radical libre por parte de los hidroxilos fenólicos de las moléculas. Por tanto, se buscan parámetros teóricos para predecir la habilidad de los antioxidantes para atrapar los radicales libres. De esta forma, es posible predecir la actividad antioxidante y emplear el cálculo como herramienta para buscar nuevos antioxidantes.

Aunque existen un considerable número de descriptores moleculares, solo unos pocos predicen el comportamiento de las moléculas de acuerdo con las conclusiones derivadas de los datos experimentales.

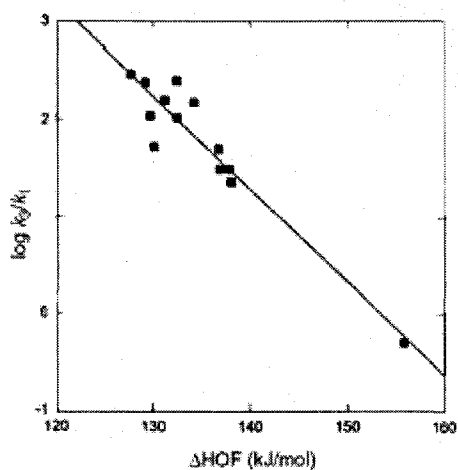
El inconveniente de aplicar métodos teóricos radica en la dificultad para evaluar como afecta la contribución de otros mecanismos antioxidantes. Factores como la capacidad quelante, la inhibición de la reacción de Fenton o la solubilidad del antioxidante, pueden jugar un papel importante en la protección de los lípidos de la oxidación.

Entre los parámetros considerados para caracterizar la actividad para atrapar los radicales de los antioxidantes se encuentran:

- La diferencia en el calor de formación entre el antioxidante y el radical fenóxilo que se origina (ΔHOF).
- La energía de disociación del enlace O-H fenólico (BDE).
- O el valor absoluto de la energía del orbital ocupado de mayor energía (HOMO).

Como consecuencia del elevado número de átomos de algunas moléculas antioxidantes, la mayoría de las veces se recurre a cálculos basados en métodos semiempíricos de mecánica molecular, empleándose cálculos más precisos *ab initio* o mediante la teoría funcional de densidad (DFT), en casos muy concretos (Tanaka et al, 1991; Tomiyama et al, 1993, Tsimidou, 2003).

Zhang y colaboradores emplean métodos semiempíricos (AM1, MNDO y PM3) para calcular distintos parámetros teóricos de 15 antioxidantes, entre ellos, varios flavonoides, ácidos fenólicos, vitamina E o BHT. Encuentran que métodos basados en cálculos semiempíricos AM1 para calcular diferencias entre calores de formación del radical y la molécula original (ΔHOF), correlacionan de forma "aceptable" ($r=0.9491$) con valores de constantes de velocidad experimentales en test acelerados de oxidación, figura 119. Valores bajos de ΔHOF indican mayor estabilidad del radical fenoxilo formado, por tanto, mayor actividad antioxidante.



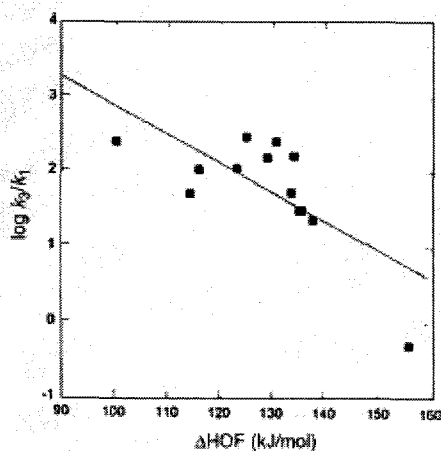
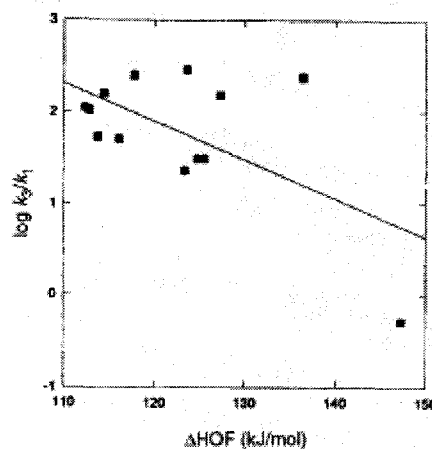
Correlación con AM1 ($r=0.9491$)

-Figura 119-

Los valores de ΔHOF que obtienen por los métodos semiempíricos MNDO y PM3 no correlacionan muy bien con los datos experimentales, figura 120.

Indican además que cálculos teóricos de longitud y orden de enlace, para ver la facilidad de la molécula para donar el hidrógeno, no son adecuados para predecir el comportamiento antioxidante de las moléculas.

El mismo autor, en un artículo posterior, llega a la conclusión de que no es correcto el empleo de métodos semiempíricos AM1 para calcular ΔHOF , ni las energías de niveles HOMO de moléculas antioxidantes, siendo necesario recurrir a métodos *ab initio* para una evaluación correcta de estos parámetros (Zhang et al, 1999).

Correlación con MNDO ($r=0.7098$)Correlación con PM3 ($r=0.5911$)

-Figura 120-

Bakalbassis y Tsimidou realizan cálculos *ab initio* y DFT sobre los ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico para explicar de forma cualitativa la dependencia estructural que existe en la actividad antioxidante de estos compuestos. De todos los descriptores moleculares que obtienen (frecuencias de vibración, longitudes de enlace, orbitales HOMO...) solamente ΔHOF , a partir de cálculos DFT, correlaciona bien con la actividad antioxidante de moléculas que muestran similares parámetros estructurales.

En esta línea Tsimidou vuelve a realizar cálculos mediante la teoría funcional de densidad (DFT) de varios ácidos cinámicos y derivados para evaluar el efecto de la cadena lateral sobre la actividad antioxidante de la molécula. Encuentra de forma cualitativa que el orden de actividad dado por los parámetros teóricos de energía de disociación de enlace y potenciales de ionización, están en concordancia con los datos experimentales de actividad antioxidante (DPPH e índice de peróxidos) y con las observaciones sobre el efecto de grupos dadores o deslocalizadores de electrones en la molécula (Tsimidou et al, 2003).

Como vemos, las aproximaciones teóricas que realizan los distintos autores, sino son con cálculos *ab initio*, se limitan, en el mejor de los casos, a pobres correlaciones entre los cálculos teóricos y constantes de velocidad experimentales de actividad antioxidante. En cualquier caso, las conclusiones se sacan de forma cualitativa viendo si incrementos en los parámetros teóricos se corresponden con ganancias de actividad o viceversa.

Después de estudiar detenidamente las referencias, consideramos que los autores arrastran dos tipos de error en sus procedimientos de cálculo.

En primer lugar, las constantes de velocidad, se obtienen en experimentos de evaluación de la actividad antioxidante realizados sobre modelos, como por ejemplo, experimentos de inducción a la oxidación con metales, medidas de potenciales redox o de cinéticas de inhibición de formación de radicales. Estos experimentos no tienen en cuenta el comportamiento real del antioxidante dentro de una matriz tan compleja como un aceite, aunque sí que sirven como una buena aproximación su comportamiento, obteniéndose importante información, sobre todo comparativa, entre antioxidantes de distintas familias.

En segundo lugar, en los estudios teóricos realizados por estos autores, solamente tienen en cuenta la formación de una especie radical sobre la molécula, siempre la más estable. Sin embargo, existe más de una posición útil capaz de atrapar un radical (o lo que es lo mismo, donar hidrógeno) y que contribuya de alguna manera a la actividad antioxidante final de la molécula.

Por tanto, creemos que es necesario emplear datos experimentales obtenidos en ensayos más aproximados al comportamiento antioxidante real de la molécula en un alimento, como pueden ser los datos de rancimat. Además, la correlación con los datos teóricos debe de realizarse teniendo en cuenta la contribución de las otras especies radicalarias que se puedan formar en la molécula mediante cálculos energéticos adicionales.

Siguiendo estas consideraciones, los cálculos semiempíricos (con todas sus ventajas) pueden ser adecuados para determinar el comportamiento antioxidante de compuestos orgánicos y una herramienta muy eficaz para la investigación de nuevas moléculas.

4.5.1 Metodología de cálculo empleada.

Los procedimientos de cálculo se realizaron de la siguiente forma:

La optimización geométrica se realizó mediante cálculos semiempíricos de mecánica molecular PM3 empleando el programa de modelización HyperChem 6.03, obteniéndose los correspondientes valores de energía electrónica con el método Hartree-Fock restringido (RHF), para los alcoholes (IX-XX) y (LVII-LX) respectivamente.

De igual forma, se calcularon las energías mediante el método Hartree-Fock sin restringir (UHF) de los radicales sobre cada una de las posiciones con hidrógenos abstraibles, para todas las moléculas consideradas.

Con estos datos, se calcularon los correspondientes valores de energía de disociación de enlace (BDE) para cada uno de enlaces OH de las moléculas, mediante la diferencia de las energías que resulta al considerar el radical junto al átomo de hidrógeno abstraído, respecto a la energía de la molécula original. Valores bajos de BDE, implican facilidad para liberar el átomo hidrógeno y mayor estabilidad del radical sobre el antioxidante, que en definitiva es lo que determina una mayor actividad antioxidante. La tabla 18 representa los correspondientes valores de energía de disociación de enlace obtenidos por este procedimiento para cada uno de los hidroxilos de las moléculas.

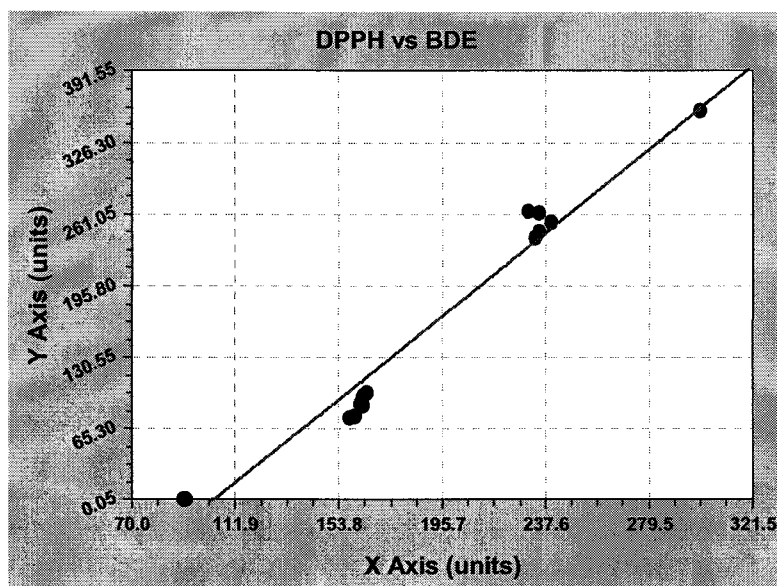
	a	b	c	d	Σ energías	H	DPPH	Rancimat	DPPHxH	RancimatxH
IX	91.0021	71.4059	71.0895		233.4975	3	79.8	16.8	239.4	50.4
XIII	90.9238		71.3887		162.3125	2	44.1	10.6	88.2	21.2
XVII	90.918				90.918	1	1	10.6	1	10.59
X	91.853	71.7768	71.2182		234.848	3	81.7	17.8	245.1	53.4
XIV	91.8445		71.5371		163.3816	2	43.6	10.9	87.2	21.8
XVIII	91.8342				91.8342	1	0.5	10.6	0.5	10.6
XI	92.0005	71.71	71.1562		234.8667	3	87.2	18.9	261.6	56.7
XV	92.1594		71.4702		163.6296	2	47.7	10.5	95.4	20.9
XIX	91.9932				91.9932	1	0.5	10.4	0.5	10.4
XII	91.2996	70.72	68.7454		230.765	3	87.7	17.0	263.1	51
XVI	91.2805		69.0891		160.3696	2	38.8	10.1	77.6	20.28
LVII	91.1799	70.8976	67.1747	71.2566	300.5088	4	89.9	23.7	359.6	94.8
LVIII	94.3796	74.9585	70.4443		239.7824	3	84.5	14.7	253.5	56.1
LIX	94.3461		70.6818		165.0279	2	48.9	11.5	97.8	23
LX	91.751		66.2766		158.0276	2	37.6	10.66	75.2	21.32

-Tabla 18-

Como se puede ver en la tabla, los radicales más estables son siempre los que se originan sobre la posición 4 del anillo (entradas a-d de la tabla), por tanto, ésta va a ser la posición donde se origina en primer lugar el radical. Pero existen otras posiciones donde posteriormente se pueden originar radicales, que, aunque menos estables, también van a contribuir a la actividad antioxidante. La suposición con la que se va a trabajar en esta investigación consiste en considerar las energías de disociación de enlace de los restantes hidroxilos y trabajar con una sumatoria global de energías de radicales donde todas las posiciones contribuyen a la actividad antioxidante de la molécula, tabla 18.

4.5.2 Resultados y discusión.

Los datos experimentales obtenidos de los estudios de actividad antioxidante mediante DPPH y rancimat para los alcoholes fenólicos (IX-XX) y (LVII-LX) han sido correlacionados con las energías globales de BDE mediante el programa CurveExpert 1.3 obteniéndose muy buenas correlaciones entre los datos experimentales y teóricos como se puede observar en las siguientes representaciones gráficas, figura 121.

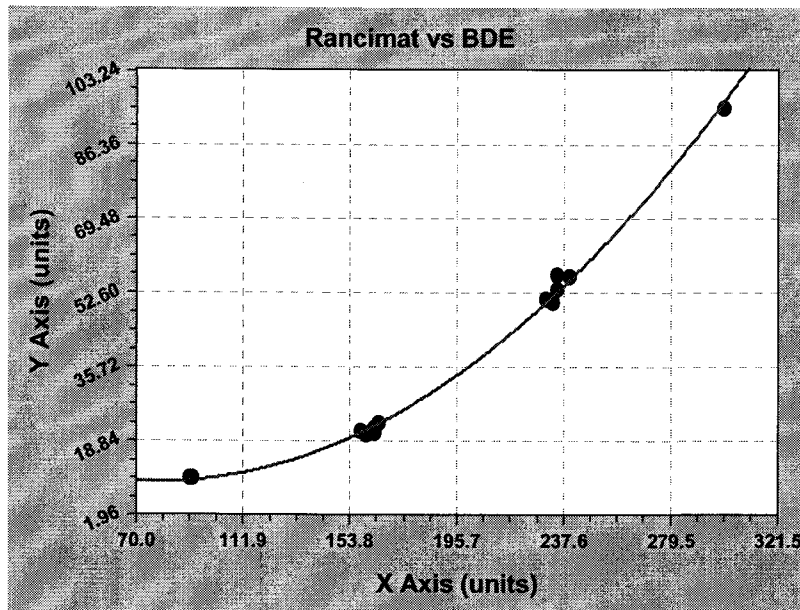


Linear Fit: $y=a+bx$

$a = -185.96445$

$b = 1.8119021$

Correlation Coefficient: 0.9849798



Quadratic Fit: $y=a+bx+cx^2$

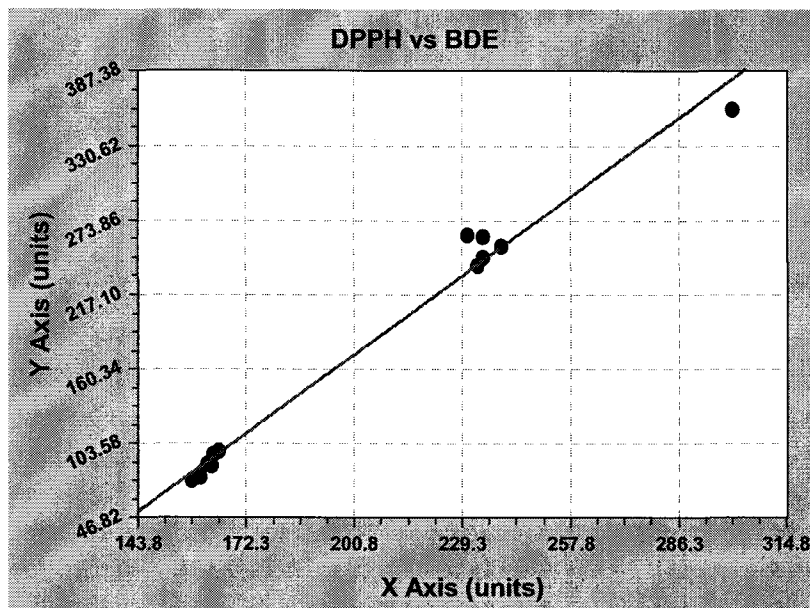
Coefficient Data:

a = 20.582121

b = -0.27534129

c = 0.0017550766

Correlation Coefficient: 0.9982925



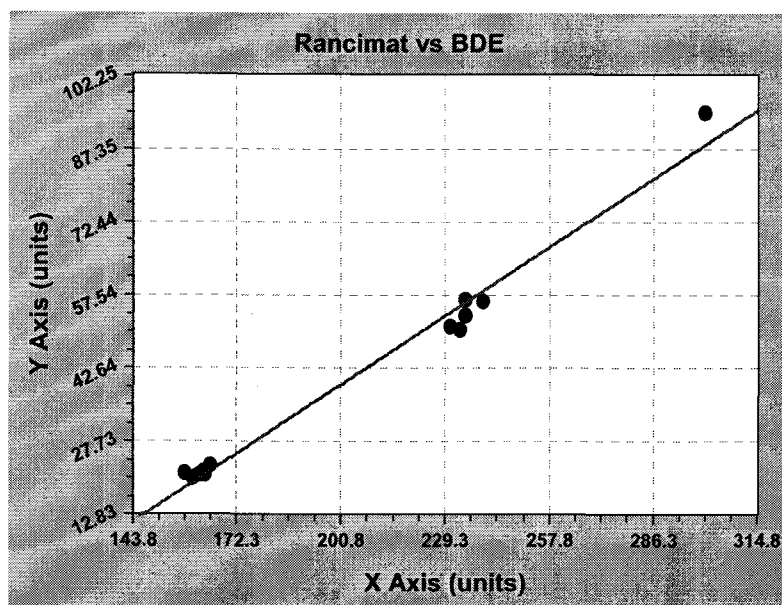
Linear Fit: $y=a+bx$

Coefficient Data:

a = -251.01896

b = 2.1067806

Correlation Coefficient: 0.9918093



Linear Fit: $y=a+bx$

Coefficient Data:

$a = -58.999945$

$b = 0.48994316$

Correlation Coefficient: 0.9914906

-Figura 121-

Se ha tenido en cuenta además a la hora de realizar las correlaciones, el número de hidrógenos disponibles en cada molécula como factor corrector de las medidas experimentales, encontrándose los mejores resultados cuando se multiplica el % de inhibición o el periodo de inducción del aceite por el número de hidrógenos disponibles en la molécula (tabla 18).

Los puntos de la parte inferior de las curvas corresponden a los derivados completamente metoxilados de baja o nula capacidad antioxidante y a continuación, los compuestos metilados posición tres. En la zona central de las gráficas se localizan los compuestos con el anillo de catecol libre, siendo incrementada la actividad con la presencia de un tercer hidroxilo en el anillo, correspondiente al punto de la parte superior de las representaciones.

Cuando se descartan las moléculas que carecen de actividad antioxidante (XVII, XVIII y XIX) se obtienen excelentes correlaciones lineales entre los datos experimentales y teóricos.

Tenemos por tanto, una herramienta para predecir qué distribución de grupos funcionales van a originar las estructuras más activas. Es de suponer, que estructuras con sustituciones en el anillo distintas a la 3,4 (sustitución *orto*,

considerada como disposición espacial de grupos más activa), se sitúen en las gráficas entre los intervalos lineales que separan cada una de las familias de antioxidantes consideradas.

PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL

Material y Métodos.

Todos los reactivos empleados en las síntesis químicas se adquirieron con el suficiente grado de pureza a través de Sigma-Aldrich. El ester etílico de los ácidos EPA y DHA fue suministrado por Larodan Lipids (Suecia). Los disolventes secos utilizados en las reacciones de síntesis se adquirieron a través de Fluka. Para síntesis enzimática se empleó lipasa B de "*candida antartica*" (Novozym 435) suministrada amablemente por Novo Nordisk (Dinamarca). Los antioxidantes comerciales utilizados se adquirieron a través Sigma-Aldrich.

Las cromatografías en capa fina se realizaron sobre cromatofolios de aluminio de gel de sílice 60 Macherey Nagel ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ y se revelaron con el revelador de Mostain (20 g. De molibdato amónico tetrahidrato, 0.4 g de Ce(SO₄)₂ y 10% de H₂SO₄ en 400 ml de agua). Las cromatografías en columna se hicieron con rellenos de gel de sílice 60, 200-400 mallas de Aldrich.

Los espectros de RMN se registraron en espectrómetros Bruker AM-300 y AMX-300 (¹H, 300 MHz; ¹³C, 75 MHz) y AMX-400 (¹H, 400 MHz; ¹³C, 100 MHz). En todos los casos los desplazamientos químicos se expresan en ppm (utilizándose el tetrametilsilano o el disolvente como referencia interna) y las constantes de acoplamiento se expresan en Hertzios.

Los espectros de masas se han obtenido por ionización química usando metano como ionizador en un aparato Hewlett-Packard 5988, los espectros FABMS con un Fisons VG Platform II y los pesos moleculares con un Fisons VG Autospec-Q.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Gallenkamp Melting Point.

Para la extracción de fase sólida se empleó cartuchos de diferentes volúmenes y con rellenos de sílice, C₁₈-diol, y amino adquiridos a través de Supelco.

La evaluación de la estabilidad oxidativa de aceites se realizó determinando el tiempo de inducción a la oxidación mediante un aparato Rancimat 743, de Metrohm-Herisau A. G.

Para las determinaciones espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro Cary 100 Scan UV-Vis de Varian.

Síntesis química de 3,4-dihidrobencil alcohol (IX).

Una disolución del ácido 3,4-dihidroxibenzoico (I) (5 g, 32.4 mmol) en THF seco (50mL) se añadió desde un embudo de adición compensada sobre una disolución de LiAlH₄ (3.02 g, 81 mmol) en THF seco(350 mL), enfriada previamente por debajo de 0°. Una vez realizada la adición, la disolución se calentó a reflujo durante 14 horas, posteriormente se enfrió en un baño de hielo y se destruyó el exceso de LiAlH₄ añadiendo cuidadosamente agua (100 mL) y ClH 5 N (100 mL). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 250 mL), se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró en el rotavapor. El crudo se purificó por cromatografía en columna adsorbiendo el residuo físicamente sobre gel de sílice y empleando como fase móvil éter. Se obtuvo (IX) como un sólido ligeramente amarillento (3,1 g, 66%).

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): 6.79 (d, J=1.95 Hz, 1H, aromático), 6.71 (d, J=8.03 Hz, 1H, aromático), 6.66 (dd, J=8.03, 1.98 Hz, 1H, aromático), 4.41 (s, 2H, PhCH₂OOC-).

Síntesis química de 2-(3,4-dihidroxifenil)etanol (X).

Una disolución del ácido (3,4-dihidroxifenil) acético (II) (5 g, 30 mmol) en THF seco (50mL) se añadió desde un embudo de adición compensada sobre una disolución de LiAlH₄ (3.5 g, 92 mmol) en THF (350 mL) enfriada previamente por debajo de 0°. Una vez realizada la adición, la disolución se

calentó a reflujo durante 3 horas, posteriormente se enfrió en un baño de hielo y se destruyó el exceso de LiAlH_4 añadiendo cuidadosamente agua (100 mL) y ClH 5 N (100 mL). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 250 mL), se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró en el rotavapor. El crudo se purificó por cromatografía en columna adsorbiendo el residuo físicamente sobre gel de sílice y empleando como fase móvil una mezcla hexano:éter 2:1. Se obtuvo (X) como un sirupo ligeramente amarillento (4,8 g, 75%) que cristalizó después de 24h de secado a vacío.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3): 6.78 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, aromático), 6.73 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, aromático), 6.63 (dd, $J=8.0, 1.5$ Hz, 1H, aromático), 3.60 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{OOC}-$), 2.55 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, ar- CH_2-).

Síntesis química de 3-(3,4-dihidroxifenil)propanol (XI).

Una disolución del ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propiónico (III) (2.5 g, 14 mmol) en THF seco (50mL) se añadió desde un embudo de adición compensada sobre una disolución de LiAlH_4 (1.3 g, 35.1 mmol) en THF (250 mL) enfriada previamente por debajo de 0° . Una vez realizada la adición, la disolución se calentó a reflujo durante 3 horas, posteriormente se enfrió en un baño de hielo y se destruyó el exceso de LiAlH_4 añadiendo cuidadosamente agua (100 mL) y ClH 5 N (100 mL). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 250 mL), se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró en el rotavapor. El crudo se purificó por cromatografía en columna adsorbiendo el residuo físicamente sobre gel de sílice y empleando como fase móvil una mezcla éter:hexano 10:1, obteniéndose (XI) como un sirupo transparente (1.65 g, 70%).

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3): 6.64 (d, $J=7.99$ Hz, 1H, aromático), 6.61 (d, $J=2.08$ Hz, 1H, aromático), 6.49 (dd, $J=8.0, 2.07$ Hz, 1H, aromático), 3.53 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{OOC}-$), 2.50 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, ar- CH_2-), 1.75 (q, $J=6.5$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$).

Síntesis química 3,4-dihidroxicinamil alcohol (XII).

Una disolución del ácido 3,4-dihidroxicinámico (IV) (3.0 g, 16.6 mmol) en THF seco (50mL) se añadió desde un embudo de adición compensada sobre

una disolución de LiAlH_4 (1.6 g, 41.6 mmol) en THF (350 mL) enfriada previamente por debajo de 0° . Una vez realizada la adición, la disolución se calentó a reflujo durante 3 horas, posteriormente se enfrió en un baño de hielo y se destruyó el exceso de LiAlH_4 añadiendo cuidadosamente agua (100 mL) y ClH 5 N (100 mL). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 250 mL), se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró en el rotavapor. El crudo se purificó por cromatografía en columna adsorbiendo el residuo físicamente sobre gel de sílice y empleando como fase móvil una mezcla éter:hexano 10:1, obteniéndose (XII) como un sólido blanco (1.65 g, 60%).

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3): 6.90 (s, 1H, aromático), 6.73 (s, 2H, aromático), 6.45 (dt, $J=14.4, 1.4$ Hz, 1H, Ph-CH=CH-CH_2 -), 6.13 (dt, $J=15.8, 6.0$ Hz, 1H, Ph-CH=CH-CH_2 -), 4.18 (dd, $J=6.0, 1.4$ Hz, Ph-CH=CH-CH_2 -).

Síntesis química 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) propanol (XV).

Una disolución del ácido 3-(4-Hidroxi-3-metoxifenil) propiónico (V) (1 g, 5.0 mmol) en THF seco (50 mL) se añadió desde un embudo de adición compensada sobre una disolución de LiAlH_4 (0.484 g, 12.8 mmol) en THF (100 mL) enfriada previamente por debajo de 0° . Una vez realizada la adición, la disolución se calentó a reflujo durante 3 horas, posteriormente se enfrió en un baño de hielo y se destruyó el exceso de LiAlH_4 añadiendo cuidadosamente agua (50 mL) y ClH 5 N (50 mL). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 150 mL), se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró en el rotavapor. El crudo se purificó por cromatografía en columna adsorbiendo el residuo físicamente sobre gel de sílice y empleando como fase móvil una mezcla éter:hexano 10:1, obteniéndose (XV) como un sirupo transparente (0.61 g, 67%).

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3): 6.75 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, aromático), 6.69 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, aromático), 6.60 (dd, $J=8.0, 1.84$ Hz, 1H, aromático), 3.80 (s, 3H, OCH_3) 3.54 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{OOC}-$), 2.57 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, ar-CH_2 -), 1.78 (q, $J=6.6$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$ -).

Síntesis química 4-hidroxi-3-metoxicinamil alcohol (XVI).

Una disolución del ácido 4-Hidroxi-3-metoxicinámico (VI) (1 g, 5,2 mmol) en THF seco (50mL) se añadió desde un embudo de adición compensada sobre una disolución de LiAlH_4 (0.523g, 13.8 mmol) en THF (100 mL) enfriada previamente por debajo de 0° . Una vez realizada la adición, la disolución se calentó a reflujo durante 2.5 horas, posteriormente se enfrió en un baño de hielo y se destruyó el exceso de LiAlH_4 añadiendo cuidadosamente agua (50 mL) y ClH 5 N (50 mL). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 150 mL), se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró en el rotavapor. El crudo se purificó por cromatografía en columna adsorbiendo el residuo físicamente sobre gel de sílice y empleando como fase móvil una mezcla éter:hexano 10:1, obteniéndose (XVI) como un sólido blanco (0.68 g, 73%).

RMN- ^1H (300 mHz, CDCl_3): 6.95 (d, $J=1.74$ Hz, 1H, aromático), 6.81 (dd, $J=7.9$, 1.81 Hz, 1H, aromático), 6.71 (d, $J=8.14$ Hz, 1H, aromático), 6.46 (d, $J=15.8$ Hz, 1H, $\text{PhCH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 6.16 (dt, $J=15.8$, 5.9 Hz, 1H, $\text{PhCH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 4.16 (d, $J=5.9$ Hz, $\text{PhCH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 3.80 (s, 3H, OCH_3).

Síntesis química 3-(3,4-dimetoxifenil) propanol (XIX).

Una disolución del ácido 3-(3,4-dimetoxifenil) propiónico (VII) (1.0 g, 5.1 mmol) en THF seco (50mL) se añadió desde un embudo de adición compensada sobre una disolución de LiAlH_4 (0.483 g, 12.7 mmol) en THF (100 mL) enfriada previamente por debajo de 0° . Una vez realizada la adición, la disolución se calentó a reflujo durante 2 horas, posteriormente se enfrió en un baño de hielo y se destruyó el exceso de LiAlH_4 añadiendo cuidadosamente agua (50 mL) y ClH 5 N (50 mL). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 150 mL), se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró en el rotavapor. El crudo se purificó por cromatografía en columna adsorbiendo el residuo físicamente sobre gel de sílice y empleando como fase móvil una mezcla éter:hexano 15:1, obteniéndose (XIX) como un sirupo transparente (0.67 g, 67%).

RMN- ^1H (300 mHz, CDCl_3): 6.83 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, aromático), 6.79 (d, $J=1.9$ Hz, 1H, aromático), 6.72 (dd, $J=8.0$, 1.9 Hz, 1H, aromático), 3.79 (s, 3H, OCH_3),

3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.54 (t, J=6.5 Hz, 2H, -CH₂OOC-), 2.60 (t, J=7.4 Hz, 2H, ar-CH₂-), 1.79 (q, J=6.5 Hz, 2H, -CH₂-).

Síntesis química 3,4-dimetoxicinamil alcohol (XX).

Una disolución del ácido 3,4-dimetoxicinámico (VIII) (1 g, 4.8 mmol) en THF seco (50mL) se añadió desde un embudo de adición compensada sobre una disolución de LiAlH₄ (0.448 g, 12.0 mmol) en THF (100 mL) enfriada previamente por debajo de 0°. Una vez realizada la adición, la disolución se calentó a reflujo durante 1.5 horas, posteriormente se enfrió en un baño de hielo y se destruyó el exceso de LiAlH₄ añadiendo cuidadosamente agua (50 mL) y ClH 5 N (50 mL). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 150 mL), se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró en el rotavapor. El crudo se purificó por cromatografía en columna adsorbiendo el residuo físicamente sobre gel de sílice y empleando como fase móvil una mezcla éter:hexano 15:1, obteniéndose un sirupo transparente (0.774 g, 83%), cuyo RMN se corresponde con el compuesto (XIX).

Síntesis química de oleato de 2-(3,4-dihidroxiifenil) propanol (XL).

A una disolución de 3,4-dihidroxiifenil propanol (XI) (100 mg, 0.65 mmol) THF seco (5 ml) se le adicionó K₂CO₃ anhidro (90mg, 0.65 mmol), cloruro oleilo (0.27 ml, 0.75 mmol) e hidrógeno sulfato de tetrabutilamonio (TBAH). La mezcla se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante 24h, y a continuación se filtró y evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano (50mL), se lavó con agua (2x50mL) y la fase orgánica se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de hexano-éter etílico (4:1) obteniéndose (XL) como un sirupo ligeramente amarillento (128 mg, 47%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.78 (d, J=8.1 Hz, 1H, aromático), 6.72 (d, J=2, 1H, aromático), 6.63(dd, J=8.0, 2.0 Hz, 1H, aromático), 5.34 (m, 2H, HC=CH), 4.23 (t, J=7.1 Hz, 2H, -CH₂OOC-), 2.80 (t, J=7.1 Hz, 2H, ar-CH₂-), 2.28 (t, J=7.6

Hz, 2H, -OOC-CH₂-), 1.99 (m, 4H, -CH₂-HC=CH- CH₂-), 1.58 (m, 2H, -OOC-CH₂- CH₂-), 1.26 (m, 26H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.9, 3H, -CH₃).

Síntesis química de 2-(4-hidroxi-3-oleiloxifenil) propanol (LIX-i) y 2-(3-hidroxi-4-oleiloxifenil) propanol (LIX-ii).

A una disolución de 2-(3,4-dihidroxifenil) propanol (XI) (100 mg, 0.65 mmol) en THF seco (10 ml) se le adicionó ácido oleico (0.2 mL, 0.66 mmol), dicitclohexilcarbodiimida (145 mg, 0.7 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (25 mg, 0.19 mmol) a 0°C. Una vez a temperatura ambiente, la reacción se mantuvo en agitación durante 3 h bajo atmósfera inerte. A continuación se filtró la urea precipitada y el filtrado se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano (25 ml), se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃ (1x50 ml) y con una disolución saturada de cloruro sódico (1x50 ml). La fase orgánica se secó con sulfato sódico anhidro, se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna empleando como fase móvil una mezcla hexano:eter 1:1. Se obtuvo un sólido blanco (182 mg, 67%) que resultó ser una mezcla (1:1) de los dos derivados monooleatos sobre las posiciones fenólicas (LIX-i) y (LIX-ii).

RMN-¹H de la mezcla 1:1 de los compuestos LIX-i y LIX-ii (300 MHz, CDCl₃): 6.95 (d, J=8.1 Hz, 1 H, aromático), 6.90 (dd, J=5.3, 2.1 Hz, 2H, aromático), 6.92 (s, 1 H, aromático), 6.80 (d, J=2.1 Hz, 1H, aromático), 6.72 (dd, J=8.2, J=2.1 Hz, 1H, aromático), 6.15 (m, OH), 5.75 (m, OH), 5.34 (m, 4H, HC=CH), 3.79 (t, J=6.4 Hz, 4H -CH₂OH), 2.76 (t, J=6.4 Hz, 4H, -ar-CH₂-), 2.56 (t, J=7.4 Hz, 4H, -ar-OOC-CH₂-), 1.99 (m, 8H, -CH₂-HC=CH- CH₂-), 1.75 (m, 4H, -ar-OOC-CH₂- CH₂-), 1.25 (m, 56H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.9 Hz, 6H, -CH₃).

Síntesis química de 2-(3,4-dioleiloxifenil) propanol (LXI).

A una disolución de 2-(3,4-dihidroxifenil) propanol (XI) (120 mg, 0.78 mmol) en THF seco (10 ml) con agitación se le adicionó ácido oleico (542 uL, 483 mg, 1.71 mmol), dicitclohexilcarbodiimida (354 mg, 1.71 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (20 mg, 0.171 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó bajo argón durante 2h a temperatura ambiente. A continuación se filtró la

urea precipitada y el filtrado se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano (25 ml), se lavó dos veces con una disolución saturada de NaHCO_3 (2 x 25 mL) y una vez con una disolución saturada de cloruro sódico (1x50 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se evaporaron a sequedad. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de hexano-éter etílico (5:1). Se obtuvo (LXI) como un sirupo transparente que cristaliza después de secado a vacío (384 mg, 72%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl_3): 7.09 (m, sistema AB, 2H aromático), 7.02 (s, 1H, aromático), 5.34 (m, 4H, $\text{HC}=\text{CH}$), 3.84 (t, $J=6.4$ Hz, 2H $-\text{CH}_2\text{OOC}-$), 2.84 (t, $J=6.4$ Hz, 2H $\text{ar}-\text{CH}_2-$), 2.51 (t, $J=7.5$ Hz, 4H $\text{ar}-\text{OOC}-\text{CH}_2-$), 2.01 (m, 8H, $-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 1.72 (m, 4H, $-\text{ar}-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.24 (m, 56H $-\text{CH}_2-$), 0.87 (t, $J=6.9$, 6H, $-\text{CH}_3$).

Síntesis química oleato de 2-(3,4-dioleiloxifenil) propilo (LXII).

A una disolución de 2-(3,4-dihidroxifenil) propanol (XI) (100mg, 0.65 mmol) en piridina seca (5 ml) se le adicionó cloruro de oleilo (1 ml, 4.29 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (50 mg, 0.4 mmol). La mezcla de reacción se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante 1h. A continuación la mezcla se co-evaporó con tolueno (3x10ml) a sequedad. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de hexano-éter etílico (15:1) obteniéndose (LXII) como un sirupo transparente (574 mg, 93%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl_3): 7.09 (m, sistema AB, 2H aromático), 7.04 (s, 1H, aromático), 5.35 (m, 6H, $\text{HC}=\text{CH}$), 4.28 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{OOC}-$), 2.92 (t, $J=6.9$ Hz, 2H $\text{ar}-\text{CH}_2-$), 2.52 (t, $J=7.7$ Hz, 4H $\text{ar}-\text{OOC}-\text{CH}_2-$), 2.28 (t, $J=7.4$ Hz, 2H $-\text{CH}_2-\text{OOC}-\text{CH}_2-$), 2.00 (m, 12H, $-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 1.73 (m, 4H, $-\text{ar}-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.58 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.24 (m, 84H $-\text{CH}_2-$), 0.87 (t, $J=6.9$, 9H, $-\text{CH}_3$).

Síntesis química de oleato 3,4-dihidroxibencilo (XXVIII).

A una disolución de 3,4-dihidroxibencil alcohol (IX) (54 mg, 0.41 mmol) en THF seco (5 ml), se le adicionó K_2CO_3 anhidro (113 mg, 0.82 mmol), cloruro

oleilo (0.136 ml, 0.41 mmol) e hidrógeno sulfato de tetrabutilamonio (TBAH). La mezcla se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante 24h, y a continuación se filtró y evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano (50mL), se lavó con agua (2x50mL) y la fase orgánica se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de hexano-éter etílico (10:1) obteniéndose (XXVIII) como un sirupo ligeramente amarillento (60 mg, 36%).

RMN-¹H (300 mHz, CDCl₃): 6.88 (s, 1H, aromático), 6.83 (d, sistema AB, J=8.0 Hz, 1H, aromático), 6.79 (d, sistema AB, J=8.4, 1.7 Hz, 1H, aromático), 5.34 (m, 2H, HC=CH), 4.99 (s, 2H, PhCH₂OOC-), 2.32 (t, J=7.5 Hz, 2H, -OOC-CH₂-), 1.99 (m, 4H, -CH₂-HC=CH- CH₂-), 1.61 (q, J= 6.8 Hz, 2H, -OOC-CH₂- CH₂-), 1.26 (m, 26H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.7, 3H, -CH₃).

Síntesis química de oleato de 2-(3,4-dihidroxifenil) etilo (XXXIV).

A una disolución de 3,4-dihidroxifenil etanol (X) (100 mg, 0.65 mmol) THF seco (5 ml) se le adicionó K₂CO₃ anhidro (90mg, 0.65 mmol), cloruro oleilo (0.27 ml, 0.75 mmol) e hidrógeno sulfato de tetrabutilamonio (TBAH). La mezcla se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante 24h, y a continuación se filtró y evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano (50mL), se lavó con agua (2x50mL) y la fase orgánica se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de hexano-éter etílico (4:1) para obtener de un sirupo ligeramente amarillento (128 mg, 47%) que corresponde con (XXXIV).

RMN-¹H (300 mHz, CDCl₃): 6.78 (d, J=8.1 Hz, 1H, aromático), 6.72 (d, J=2, 1H, aromático), 6.63 (dd, J=8.0, 2.0 Hz, 1H, aromático), 5.34 (m, 2H, HC=CH), 4.23 (t, J=7.1 Hz, 2H, -CH₂OOC-), 2.80 (t, J=7.1 Hz, 2H, ar-CH₂-), 2.28 (t, J=7.6 Hz, 2H, -OOC-CH₂-), 1.99 (m, 4H, -CH₂-HC=CH- CH₂-), 1.58 (m, 2H, -OOC-CH₂- CH₂-), 1.26 (m, 26H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.9, 3H, -CH₃).

Síntesis química oleato de 3,4-dihidroxicinamilo (XLVI).

A una disolución de 3,4-dihidroxicinamil alcohol (XVI) (100 mg, 0.59 mmol) en THF seco (5 ml), se le adicionó K_2CO_3 anhidro (165 mg, 1.19 mmol), cloruro oleilo (0.190 ml, 0.41 mmol) e hidrógeno sulfato de tetrabutilamonio (TBAH). La mezcla se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante 24h, y a continuación se filtró y evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano (50mL), se lavó con agua (2x50mL) y la fase orgánica se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente diclorometano obteniéndose (XLVI) como un sirupo ligeramente amarillento (115 mg, 44 %).

Síntesis enzimática de butirato de 3,4-dihidroxi-bencilo (XXV).

A una suspensión de 3,4-dihidroxi-bencil alcohol (IX) (60 mg, 0.43 mmol) en butirato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (50 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y abierta a la atmósfera hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (15h). El crudo se diluyó a continuación en diclorometano (50 mL), se filtró y se lavó con salmuera (25 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró en el rotavapor. El exceso de butirato de etilo se eliminó en la bomba de alto vacío obteniéndose (XXV) (68 mg, 75%) sin necesidad de más etapas de purificación adicionales.

RMN- 1H (300 mHz, $CDCl_3$): 6.88 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, aromático), 6.83 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, aromático), 6.79 (dd, $J=8.0, 1.7$ Hz, 1H, aromático), 4.99 (s, 2H, $PhCH_2OOC-$), 2.31 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, $-COO-CH_2-$), 1.65 (h, $J=7.4$ Hz, 2H, $COO-CH_2-CH_2$), 0.92 (t, $J=7.4$, 3H, $-CH_3$).

Síntesis enzimática de palmitato de 3,4-dihidroxi-bencilo (XIX).

A una suspensión de 3,4-dihidroxi-bencil alcohol (IX) (60 mg, 0.43 mmol) en palmitato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y a vacío hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (16 h). A continuación, el crudo se

disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (1:1) como fase móvil, obteniéndose (XIX) como un sólido blanco (165 mg, 98%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.89 (d, J=1.5 Hz, 1H, aromático), 6.84 (d, J=8.1 Hz, 1H, aromático), 6.79 (dd, J=8.0, 1.7 Hz, 1H, aromático), 4.99 (s, 2H, PhCH₂OOC-), 2.32 (t, J=7.4 Hz, 2H, -COO-CH₂-), 1.61 (q, J=6.0 Hz, 2H, COO-CH₂-CH₂), 1.25 (m, 24H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.4, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de estearato de 3,4-dihidroxi-bencilo (XXXIII).

A una suspensión de 3,4-dihidroxi-bencil alcohol (IX) (60 mg, 0.43 mmol) en estearato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y vacío hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (16 h). A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (1:1) como fase móvil, obteniéndose (XXIII) como un sólido blanco (130 mg, 74%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.88 (d, J=1.8 Hz, 1H, aromático), 6.83 (d, J=8.1 Hz, 1H, aromático), 6.78 (dd, J=8.0, 1.7 Hz, 1H, aromático), 4.99 (s, 2H, PhCH₂OOC-), 2.33 (t, J=7.7 Hz, 2H, -COO-CH₂-), 1.61 (q, J=7.2 Hz, 2H, COO-CH₂-CH₂), 1.25 (m, 28H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.4, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de oleato de 3,4-dihidroxi-bencilo (XXXVII).

A una suspensión de 3,4-dihidroxi-bencil alcohol (IX) (60 mg, 0.43 mmol) en oleato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y a vacío durante 6 h. A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (2:1) como fase móvil, obteniéndose (XXXVII) como sirupo ligeramente amarillento (110 mg, 63%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.88 (s, 1H, aromático), 6.83 (d, sistema AB, J=8.0 Hz, 1H, aromático), 6.79 (d, sistema AB, J=8.4, 1.7 Hz, 1H, aromático), 5.34 (m, 2H, HC=CH), 4.99 (s, 2H, PhCH₂OOC-), 2.32 (t, J=7.5 Hz, 2H, -OOC-CH₂-), 1.99 (m, 4H, -CH₂-HC=CH- CH₂-), 1.61 (q, J= 6.8 Hz, 2H, -OOC-CH₂- CH₂-), 1.26 (m, 26H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.7, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de cis-5,8,11,14,17 eicosapentenoato de 3,4-dihidroxibencilo (XLI).

A una suspensión de 3,4-dihidroxibencil alcohol (IX) (40 mg, 0.43 mmol) en cis-5,8,11,14,17 eicosapentenoato de etilo en exceso (300 mg), se adicionó Novozym 435 (30 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa a vacío durante 4 h. A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante purificó en columna cromatográfica empleando hexano: éter (10:1) como fase móvil, obteniéndose (XLI) como sirupo ligeramente amarillento (46 mg).

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): 6.88 (s, 1H, aromático), 6.81 (dd, sistema AB, J=8.1 Hz, 2H aromático), 5.35 (m, 10H, HC=CH), 4.99 (s, 2H, PhCH₂OOC-), 2.80 (m, 8H, -HC=CH-CH₂-HC=CH-), 2.34 (t, J=7.4 Hz, 2H, -OOC-CH₂-), 2.06 (m, 4H, -HC=CH-CH₂-CH₃, -HC=CH-CH₂-CH₂-) 1.69 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO-), 0.96 (t, J=7.5, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de cis-4,7,10,13,16,19 docosahexenoato de 3,4-dihidroxibencilo (XLV).

A una suspensión de 3,4-dihidroxibencil alcohol (IX) (40mg, 0.43 mmol) en cis-4,7,10,13,16,19 docosahexenoato de etilo en exceso (300 mg), se adicionó Novozym 435 (30 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y abierta a la atmósfera durante 4 h. A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante purificó en columna cromatográfica empleando hexano: éter (10:1) como fase móvil, obteniéndose (XLV) como sirupo ligeramente amarillento (45 mg).

RMN-¹H (300 mHz, CDCl₃): 6.88 (d, J=1.6 Hz, 1H, aromático), 6.83 (d, J=8.0 Hz, 1H, aromático), 6.78 (dd, J=8.0, 1.7 Hz, 1H, aromático), 5.38 (m, 12H, HC=CH), 4.99 (s, 2H, -CH₂OOC-), 2.83 (m, 10H, -HC=CH-CH₂-HC=CH-), 2.40 (m, 2H, -OOC-CH₂-), 2.39 (m, 2H, -HC=CH-CH₂-CH₂-COO-) 2.06 (q, J=7.4 Hz, 2H, -HC=CH-CH₂-CH₃), 0.96 (t, J=7.5, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de butirato de 2-(3,4-dihidroxifenil) etilo (XXVI).

A una suspensión de 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (X) (60 mg, 0.39 mmol) en butirato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (50 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y abierta a la atmósfera hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (15h). El crudo se diluyó a continuación en diclorometano (50 mL), se filtró y se lavó con salmuera (25 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró en el rotavapor. El exceso de butirato de etilo se eliminó en la bomba de alto vacío obteniéndose (XXVI) (90 mg, 59%) sin necesidad de más etapas de purificación adicionales.

RMN-¹H (300 mHz, CDCl₃): 6.78 (d, J=8.1 Hz, 1H, aromático), 6.73 (d, J=1.5 Hz, 1H, aromático), 6.63 (dd, J=8.0, 1.5 Hz, 1H, aromático), 6.19 (1 s (w), 1H, Ph-OH), 6.0 (1 s (w), 1H, Ph-OH), 4.23 (t, J=7.1 Hz, 2H, -CH₂OOC-), 2.79 (t, J=7.1 Hz, 2H, ar-CH₂-), 2.27 (t, J=7.5 Hz, 2H, -COO-CH₂-), 1.65 (h, J=7.4 Hz, 2H, COO-CH₂-CH₂), 0.92 (t, J=7.4, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de palmitato de 2-(3,4-dihidroxifenil) etilo (XXX).

A una suspensión de 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (X) (60 mg, 0.39 mmol) en palmitato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y a vacío hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (6 h). A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (1:1) como fase móvil, obteniéndose (XXX) como un sólido blanco (150 mg, 98%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.78 (d, J=8.1 Hz, 1H, aromático), 6.73 (d, J=1.5 Hz, 1H, aromático), 6.63 (dd, J=8.0, 1.5 Hz, 1H, aromático), 4.23 (t, J=7.1 Hz, 2H, -CH₂OOC-), 2.80 (t, J=7.1 Hz, 2H, ar-CH₂-), 2.28 (t, J=7.5 Hz, 2H, -COO-CH₂-), 1.58 (q, J=6.1 Hz, 2H, COO-CH₂-CH₂), 1.25 (m, 24H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.4, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de estearato de 2-(3,4-dihidroxifenil) etilo (XXXIV).

A una suspensión de 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (X) (60 mg, 0.39 mmol) en estearato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y vacío hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (6 h). A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (1:1) como fase móvil, obteniéndose (XXXIV) como un sólido blanco (155 mg, 94%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.79 (d, J=8.1 Hz, 1H, aromático), 6.72 (d, J=2.0 Hz, 1H, aromático), 6.63 (dd, J=8.0, 2.0 Hz, 1H, aromático), 4.23 (t, J=7.1 Hz, 2H, -CH₂OOC-), 2.80 (t, J=7.1 Hz, 2H, ar-CH₂-), 2.28 (t, J=7.4 Hz, 2H, -OOC-CH₂-), 1.58 (m, 2H, -OOC-CH₂-CH₂-), 1.24 (m, 28H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.9, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de oleato de 2-(3,4-dihidroxifenil) etilo (XXXVIII).

A una suspensión de 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (X) (60 mg, 0.39 mmol) en oleato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y a vacío durante 6 h. A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (2:1) como fase móvil, obteniéndose (XXXVIII) como sirupo ligeramente amarillento (152 mg, 93%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.78 (d, J=8.1 Hz, 1H, aromático), 6.72 (d, J=2.0 Hz, 1H, aromático), 6.63 (dd, J=8.0, 2.0 Hz, 1H, aromático), 5.34 (m, 2H,

HC=CH), 4.23 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{OOC}-$), 2.80 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, ar-CH_2-), 2.28 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, $-\text{OOC-CH}_2-$), 1.99 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{-HC=CH-CH}_2-$), 1.58 (m, 2H, $-\text{OOC-CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.26 (m, 20H, $-\text{CH}_2-$), 0.87 (t, $J=6.9$, 3H, $-\text{CH}_3$).

Síntesis enzimática de cis-5,8,11,14,17 eicosapentenoato de 2-(3,4-dihidroxifenil) etilo (XLII).

A una suspensión de 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (X) (60 mg, 0.39 mmol) en cis-5,8,11,14,17 eicosapentenoato de etilo en exceso (300 mg), se adicionó Novozym 435 (30 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa a vacío durante 4 h. A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante purificó en columna cromatográfica empleando hexano: éter (10:1) como fase móvil, obteniéndose (XLII) como sirupo ligeramente amarillento (87 mg).

RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3): 6.78 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, aromático), 6.72 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, aromático), 6.63 (dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, 1H, aromático), 5.35 (m, 10H, HC=CH), 4.25 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{OOC}-$), 2.81 (m, 8H, $-\text{HC=CH-CH}_2-\text{HC=CH}-$), 2.80 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, ar-CH_2-), 2.29 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, $-\text{OOC-CH}_2-$), 2.07 (m, 4H, $\text{HC=CH-CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{HC=CH-CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.67 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-$), 0.96 (t, $J=7.5$, 3H, $-\text{CH}_3$).

Síntesis enzimática de cis-4,7,10,13,16,19 docosahexenoato de 2-(3,4-dihidroxifenil) etilo (XLVI).

A una suspensión de 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (X) (60 mg, 0.39 mmol) en cis-4,7,10,13,16,19 docosahexenoato de etilo en exceso (300 mg), se adicionó Novozym 435 (30 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y abierta a la atmósfera durante 4 h. A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante purificó en columna cromatográfica empleando hexano: éter (10:1) como fase móvil, obteniéndose (XLVI) como sirupo ligeramente amarillento (78 mg).

RMN-¹H (300 mHz, CDCl₃): 6.78 (d, J=8.1 Hz, 1H, aromático), 6.72 (d, J=2.0 Hz, 1H, aromático), 6.58 (dd, J=8.0, 2.0 Hz, 1H, aromático), 5.38 (m, 12H, HC=CH), 4.23 (t, J=7.1 Hz, 2H, -CH₂OOC-), 2.81 (m, 10H, -HC=CH-CH₂-HC=CH-), 2.80 (t, J=7.1 Hz, 2H, ar-CH₂-), 2.35 (m, 2H, -OOC-CH₂-), 2.35 (m, 2H, -HC=CH-CH₂-CH₂-COO-) 2.06 (m, J=7.6 Hz, 2H, -HC=CH-CH₂-CH₃), 0.96 (t, J=7.5, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de butirato de 3-(3,4-dihidroxifenil) propilo (XXVII).

A una suspensión de 3-(3,4-dihidroxifenil) propanol (XI) (60 mg, 0.36 mmol) en butirato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (50 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y abierta a la atmósfera hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (15h). El crudo se diluyó a continuación en diclorometano (50 mL), se filtró y se lavó con salmuera (25 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró en el rotavapor. El exceso de butirato de etilo se eliminó en la bomba de alto vacío obteniéndose (XXVII) (83 mg, 97%) sin necesidad de más etapas de purificación adicionales.

RMN-¹H (300 mHz, CDCl₃): 6.77 (d, J=8.0 Hz, 1H, aromático), 6.68 (d, J=1.5 Hz, 1H, aromático), 6.58 (dd, J=8.0, 1.6 Hz, 1H, aromático), 4.07 (t, J=6.6 Hz, 2H, -CH₂OOC-), 2.55 (t, J=7.4 Hz, 2H, ar-CH₂-), 2.30 (t, J=7.5 Hz, 2H, -COO-CH₂-), 1.89 (q, J=6.7 Hz, 2H, -CH₂-), 1.65 (h, J=7.5 Hz, 2H, COO-CH₂-CH₂), 0.95 (t, J=7.4, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de palmitato de 3-(3,4-dihidroxifenil) propilo (XXXI).

A una suspensión de 3-(3,4-dihidroxifenil) propanol (XI) (60 mg, 0.36 mmol) en palmitato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y a vacío hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (16 h). A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (1:1) como fase móvil, obteniéndose (XXXI) como un sólido blanco (142 mg, 97%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.76 (d, J=8.0 Hz, 1H, aromático), 6.68 (d, J=1.8 Hz, 1H, aromático), 6.58 (dd, J=8.0, 1.8 Hz, 1H, aromático), 4.06 (t, J=6.6 Hz, 2H, -CH₂OOC-), 2.55 (t, J=7.4 Hz, 2H, ar-CH₂-), 2.30 (t, J=7.5 Hz, 2H, -COO-CH₂-), 1.88 (q, J=6.7 Hz, 2H, -CH₂-), 1.65 (q, J=7.2 Hz, 2H, COO-CH₂-CH₂), 1.24 (m, 24H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.4, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de estearato de 3-(3,4-dihidroxifenil) propilo (XXXV).

A una suspensión de 3-(3,4-dihidroxifenil) propanol (XI) (60 mg, 0.36 mmol) en estearato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y vacío hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (6 h). A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (1:1) como fase móvil, obteniéndose (XXXV) como un sólido blanco ().

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.76 (d, J=8.1 Hz, 1H, aromático), 6.69 (d, J=1.9 Hz, 1H, aromático), 6.59 (dd, J=8.1, 2.0 Hz, 1H, aromático), 4.07 (t, J=6.6 Hz, 2H, -CH₂OOC-), 2.56 (t, J=7.6 Hz, 2H, ar-CH₂-), 2.30 (t, J=7.4 Hz, 2H, -COO-CH₂-), 1.89 (q, J=6.8 Hz, 2H, -CH₂-), 1.61 (q, J=7.0 Hz, 2H, COO-CH₂-CH₂), 1.27 (m, 28H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.9, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de oleato de 3-(3,4-dihidroxifenil) propilo (XXXIX).

A una suspensión de 3-(3,4-dihidroxifenil) propanol (XI) (60 mg, 0.36 mmol) en oleato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y a vacío durante 6 h. A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (2:1) como fase móvil, obteniéndose (XXXIX) como sirupo ligeramente amarillento ().

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.76 (d, J=8.1 Hz, 1H, aromático), 6.69 (d, J=2.0 Hz, 1H, aromático), 6.58 (dd, J=8.0, 2.0 Hz, 1H, aromático), 5.33 (m, 2H, HC=CH), 4.07 (t, J=6.6 Hz, 2H, -CH₂OOC-), 2.55 (t, J=7.3 Hz, 2H, ar-CH₂-),

2.30 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, $-\text{COO}-\text{CH}_2-$), 1.99 (m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 1.89 (q, $J=6.8$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.61 (m, 2H, $-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.26 (m, 20H, $-\text{CH}_2-$), 0.87 (t, $J=6.9$, 3H, $-\text{CH}_3$).

Síntesis enzimática de cis-5,8,11,14,17 eicosapentenoato de 3-(3,4-dihidroxifenil) propilo (XLIII).

A una suspensión de 3-(3,4-dihidroxifenil) propanol (XI) (60 mg, 0.36 mmol) en cis-5,8,11,14,17 eicosapentenoato de etilo en exceso (300 mg), se adicionó Novozym 435 (30 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa a vacío durante 4 h. A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante purificó en columna cromatográfica empleando hexano: éter (10:1) como fase móvil, obteniéndose (XLIII) como sirupo ligeramente amarillento (165 mg).

RMN-¹H (400 mHz, CDCl_3): 6.76 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, aromático), 6.72 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, aromático), 6.57 (dd, $J=8.0$, 1.8 Hz, 1H, aromático), 5.37 (m, 10H, $\text{HC}=\text{CH}$), 4.07 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{OOC}-$), 2.82 (m, 8H, $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-$), 2.55 (t, $J=7.1$ Hz, 2H, ar- CH_2-), 2.33 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $-\text{OOC}-\text{CH}_2-$), 2.09 (m, 4H, $\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.89 (q, $J=6.8$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.67 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-$), 0.96 (t, $J=7.5$, 3H, $-\text{CH}_3$).

Síntesis enzimática de cis-4,7,10,13,16,19 docosahexenoato de 3-(3,4-dihidroxifenil) propilo (XLVII).

A una suspensión de 3-(3,4-dihidroxifenil) propanol (XI) (60 mg, 0.36 mmol) en cis-4,7,10,13,16,19 docosahexenoato de etilo en exceso (300 mg), se adicionó Novozym 435 (30 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y abierta a la atmósfera durante 4 h. A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante purificó en columna cromatográfica empleando hexano: éter (10:1) como fase móvil, obteniéndose (XLVII) como sirupo ligeramente amarillento (116 mg).

RMN-¹H (300 mHz, CDCl₃): 6.76 (d, J=8.1 Hz, 1H, aromático), 6.68 (d, J=1.8 Hz, 1H, aromático), 6.58 (dd, J=8.0, 1.8 Hz, 1H, aromático), 5.38 (m, 12H, HC=CH), 4.08 (t, J=6.7 Hz, 2H, -CH₂OOC-), 2.84 (m, 10H, -HC=CH-CH₂-HC=CH-), 2.56 (t, J=7.4 Hz, 2H, ar-CH₂-), 2.38 (m, 2H, -OOC-CH₂-), 2.38 (m, 2H, -HC=CH-CH₂-CH₂-COO-) 2.08 (q, J=7.3 Hz, 2H, -HC=CH-CH₂-CH₃), 1.89 (q, J=6.9 Hz, 2H, -CH₂-), 0.96 (t, J=7.5, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de butirato de 3,4-dihidroxicinamilo (XXVIII).

A una suspensión de 3,4-dihidroxicinamil alcohol (XII) (60 mg, 0.36 mmol) en butirato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (50 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y abierta a la atmósfera hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (15h). El crudo se diluyó a continuación en diclorometano (50 mL), se filtró y se lavó con salmuera (25 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró en el rotavapor. El exceso de butirato de etilo se eliminó en la bomba de alto vacío obteniéndose (XXVIII) (83 mg, 96%) sin necesidad de más etapas de purificación adicionales.

RMN-¹H (300 mHz, CDCl₃): 6.92 (s, 1H, aromático), 6.80 (s, 2H, aromático), 6.51 (d, J=15.8 Hz, 1H, Ph-CH=CH-CH₂-), 6.09 (dt, J=15.8, 6.6 Hz, 1H, Ph-CH=CH-CH₂-), 4.69 (d, J=6.5 Hz, Ph-CH=CH-CH₂-), 2.32 (t, J=7.4 Hz, 2H, -COO-CH₂-), 1.66 (h, J=7.4 Hz, 2H, COO-CH₂-CH₂), 0.95 (t, J=7.4, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de palmitato de 3,4-dihidroxicinamilo (XXXII).

A una suspensión de 3,4-dihidroxicinamil alcohol (XII) (60 mg, 0.36 mmol) en palmitato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y a vacío hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (16 h). A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (1:1) como fase móvil, obteniéndose (XXXII) como un sólido blanco (113 mg, 71%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.92 (s, 1H, aromático), 6.81 (s, 2H, aromático), 6.51 (d, J=15.8 Hz, 1H, Ph-CH=CH-CH₂-), 6.09 (dt, J=15.8, 6.6 Hz, 1H, Ph-CH=CH-CH₂-), 4.69 (d, J=6.5 Hz, Ph-CH=CH-CH₂-), 2.33 (t, J=7.4 Hz, 2H, -COO-CH₂-), 1.63 (q, J=7.0 Hz, 2H, COO-CH₂-CH₂), 1.25 (m, 24H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.3, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de estearato de 3,4-dihidroxicinamilo (XXXVI).

A una suspensión de 3,4-dihidroxicinamil alcohol (XII) (60 mg, 0.36 mmol) en estearato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y vacío hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (6 h). A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (1:1) como fase móvil, obteniéndose (XXXVI) como un sólido blanco ().

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.93 (s, 1H, aromático), 6.81 (s, 2H, aromático), 6.51 (d, J=15.8 Hz, 1H, Ph-CH=CH-CH₂-), 6.09 (dt, J=15.8, 6.6 Hz, 1H, Ph-CH=CH-CH₂-), 4.69 (d, J=6.5 Hz, Ph-CH=CH-CH₂-), 2.33 (t, J=7.5 Hz, 2H, -COO-CH₂-), 1.63 (q, J=7.1 Hz, 2H, COO-CH₂-CH₂), 1.24 (m, 28H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.4, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de oleato de 3,4-dihidroxicinamilo (XL).

A una suspensión de 3,4-dihidroxicinamil alcohol (XII) (60 mg, 0.36 mmol) en oleato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y a vacío durante 6 h. A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (2:1) como fase móvil, obteniéndose (XL) como sirupo ligeramente amarillento ().

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.93 (s, 1H, aromático), 6.81 (s, 2H, aromático), 6.51 (d, J=15.8 Hz, 1H, Ph-CH=CH-CH₂-), 6.08 (dt, J=15.8, 6.6 Hz, 1H, Ph-CH=CH-CH₂-), 5.34 (m, 2H, HC=CH), 4.69 (d, J=6.6 Hz, Ph-CH=CH-CH₂-),

2.33 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $-\text{OOC}-\text{CH}_2-$), 2.0 (m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 1.63 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, $-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.26 (m, 26H, $-\text{CH}_2-$), 0.87 (t, $J=7.0$, 3H, $-\text{CH}_3$).

Síntesis enzimática de cis-5,8,11,14,17 eicosapentenoato de 3,4-dihidrocinamilo (XLIV).

A una suspensión de 3,4-dihidroxicinamil alcohol (XII) (60 mg, 0.36 mmol) en cis-5,8,11,14,17 eicosapentenoato de etilo en exceso (300 mg), se adicionó Novozym 435 (30 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa a vacío durante 4 h. A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante purificó en columna cromatográfica empleando hexano: éter (10:1) como fase móvil, obteniéndose (XLIV) como sirupo ligeramente amarillento (52 mg).

RMN-¹H (300 mHz, CDCl_3): 6.92 (s, 1H, aromático), 6.80 (s, 2H, aromático), 6.51 (d, $J=15.8$ Hz, 1H, $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 6.09 (dt, $J=15.8, 6.6$ Hz, 1H, $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 5.36 (m, 10H, $\text{HC}=\text{CH}$), 4.69 (d, $J=6.6$ Hz, $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 2.82 (m, 8H, $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-$), 2.36 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, $-\text{OOC}-\text{CH}_2-$), 2.06 (m, 4H, $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) 1.72 (q, $J=7.4$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-$), 0.96 (t, $J=7.5$, 3H, $-\text{CH}_3$).

Síntesis enzimática de cis-4,7,10,13,16,19 docosahexenoato de 3,4-dihidrocinamilo (XLVIII).

A una suspensión de 3,4-dihidroxicinamil alcohol (XII) (60 mg, 0.36 mmol) en cis-4,7,10,13,16,19 docosahexenoato de etilo en exceso (300 mg), se adicionó Novozym 435 (30 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y abierta a la atmósfera durante 4 h. A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se lavó varias veces en un embudo de decantación con hexano (3X25 mL). El crudo resultante purificó en columna cromatográfica empleando hexano: éter (10:1) como fase móvil, obteniéndose (XLVIII) como sirupo ligeramente amarillento (50 mg).

RMN-¹H (300 mHz, CDCl_3): 6.92 (s, 1H, aromático), 6.80 (s, 2H, aromático), 6.51 (d, $J=15.8$ Hz, 1H, $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 6.09 (dt, $J=15.8, 6.6$ Hz, 1H, $\text{Ph}-$

CH=CH-CH₂-), 5.36 (m, 12H, HC=CH), 4.69 (d, J=6.6 Hz, Ph-CH=CH-CH₂-), 2.83 (m, 10H, -HC=CH-CH₂-HC=CH-), 2.41 (m, 2H, -OOC-CH₂-), 2.39 (m, 2H, -HC=CH-CH₂-CH₂-COO-) 2.07 (q, J=7.1 Hz, 2H, -HC=CH-CH₂-CH₃), 0.96 (t, J=7.5, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de palmitato de 3-Hidroxi, 4-metoxibencilo (L).

A una suspensión de 3-hidroxi, 4-metoxibencil alcohol (XIII) (60 mg, 0.39 mmol) en palmitato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y a vacío hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (16 h). A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y concentró en el rotavapor. El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (3:1) como fase móvil, obteniéndose (L) como un sólido blanco (145 mg, 95%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.87 (m, 3H, aromáticos), 5.02 (s, 2H, PhCH₂OOC-), 3.89 (s, 3H, OMe), 2.32 (t, J=7.5 Hz, 2H, -COO-CH₂-), 1.62 (q, J=7.2 Hz, 2H, COO-CH₂-CH₂), 1.25 (m, 24H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.4, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de palmitato de 2-(3-Hidroxi, 4-metoxifenil) etilo (LI).

A una suspensión de 2-(3-Hidroxi, 4-metoxifenil) etanol (XIV) (60 mg, 0.36 mmol) en palmitato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y a vacío hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (6 h). A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se llevó a sequedad. El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (3:1) como fase móvil, obteniéndose (LI) como un sólido blanco (142 mg, 97%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.83 (dd, J=6.5, 2.1 Hz, 1H, aromático), 6.71 (s, 1H, aromático), 6.69 (d, 1.8 Hz, 1H, aromático), 4.24 (t, J=7.1 Hz, 2H, -CH₂OOC-), 3.87 (s, 3H, OMe), 2.85 (t, J=7.1 Hz, 2H, ar-CH₂-), 2.27 (t, J=7.5 Hz, 2H, -COO-CH₂-), 1.58 (q, J=7.2 Hz, 2H, COO-CH₂-CH₂), 1.24 (m, 24H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.4, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de palmitato de 3-(3-Hidroxi, 4-metoxifenil) propilo (LII).

A una suspensión de 3-(3-Hidroxi, 4-metoxifenil) propanol (XV) (60 mg, 0.33 mmol) en palmitato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y a vacío hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (16 h). A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se concentró en el rotavapor. El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (3:1) como fase móvil, obteniéndose (LII) como un sólido blanco (132 mg, 95%).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): 6.82 (m, 1H, aromático), 6.67 (m, 2H, aromáticos), 4.08 (t, J=6.5 Hz, 2H, -CH₂OOC-), 3.86 (s, 3H, OMe), 2.61 (t, J=8.1 Hz, 2H, ar-CH₂-), 2.30 (t, J=7.6 Hz, 2H, -COO-CH₂-), 1.88 (q, J=8.3 Hz, 2H, -CH₂-), 1.62 (q, J=7.2 Hz, 2H, COO-CH₂-CH₂), 1.25 (m, 24H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.9, 3H, -CH₃).

Síntesis enzimática de palmitato de 3-Hidroxi, 4-metoxicinamilo (LIII)

A una suspensión de 3-Hidroxi, 4-metoxicinamil alcohol (XVI) (60 mg, 0.33 mmol) en palmitato de etilo en exceso (500 mg), se adicionó Novozym 435 (40 mg). La reacción se mantuvo a 37 °C, en agitación vigorosa y a vacío hasta que no se observó evolución de la misma por TLC (16 h). A continuación, el crudo se disolvió en acetonitrilo (75 mL), se filtró y se concentró en el rotavapor. El crudo resultante se percoló en columna empleando hexano: éter (3:1) como fase móvil, obteniéndose (LII) como un sólido blanco (113 mg, 82%).

6.92 (s, 1H, aromático), 6.81 (s, 2H, aromático), 6.51 (d, J=15.8 Hz, 1H, Ph-CH=CH-CH₂-), 6.09 (dt, J=15.8, 6.6 Hz, 1H, Ph-CH=CH-CH₂-), 4.69 (d, J=6.5 Hz, Ph-CH=CH-CH₂-), 3.87 (s, 3H, OMe), 2.33 (t, J=7.4 Hz, 2H, -COO-CH₂-), 1.63 (q, J=7.0 Hz, 2H, COO-CH₂-CH₂), 1.25 (m, 24H, -CH₂-), 0.87 (t, J=6.3, 3H, -CH₃).

Determinación de la estabilidad oxidativa de aceite oliva al Rancimat.

La evaluación de la estabilidad oxidativa de muestras de aceite de oliva, con o sin antioxidantes añadidos, se realizó determinando el tiempo de inducción a la oxidación mediante un aparato Rancimat 743, de Metrohm-Herisau A. G. La oxidación se llevó a cabo pasando un flujo de aire seco (~20L/h) a través de una alícuota de muestra (5 ± 0.001 gr) colocada en un reactor calentado a 120°C, los compuestos orgánicos volátiles desprendidos en la oxidación, se colectaron, a temperatura ambiente, en celdas de conductividad con agua Milli Q (60 mL), el tiempo de inducción a la oxidación vino dado por el tiempo que tardó en alcanzarse un valor determinado de conductividad (5000 uS) en la celda.

Determinación de la capacidad de captación de radicales libres por el método del radical DPPH.

Para la determinación de la capacidad de captación de radicales de los nuevos derivados, se añadieron 2 mL de una disolución recién preparada y protegida de la luz del radical 2,2 difenil-1-picrilhidracilo, DPPH \cdot , 250 uM en etanol HPLC, sobre 2 mL de disoluciones de distinta concentración de cada uno de los antioxidantes a ensayar, de forma que las concentraciones finales en la mezcla fueron 0.5, 5, 10, 25 y 50 uM. Cada muestra se agitó vigorosamente durante 1 minuto en Vortex (2500 rpm), y se guardó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Utilizando etanol HPLC como blanco y una mezcla de 2 mL de disolución de DPPH \cdot en 2 mL de etanol HPLC como control, se midió la reducción producida en la absorbancia a 517 nm en cada una de las muestras ensayadas. Cada una de las determinaciones se realizó por triplicado. La capacidad de captación de radicales libres de los nuevos derivados se expresó mediante el valor IC₅₀, (concentración de antioxidante necesaria para reducir al 50% la absorbancia del control de DPPH \cdot) y por el % de inhibición de la absorbancia control (% Inhibición = $[(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}] \times 100$), donde A_{control} y A_{muestra} son las absorbancias del control y de la muestra respectivamente). Se representó gráficamente las absorbancias frente a las concentraciones y se obtuvo el valor de IC₅₀ por

interpolación en la curva. Los antioxidantes comerciales Vitamina C y ascorbil palmitato se usaron como referencia.

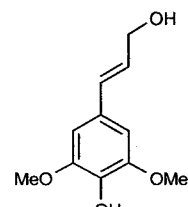
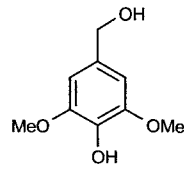
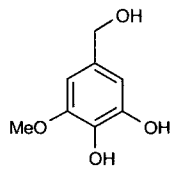
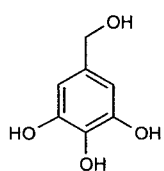
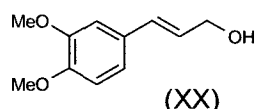
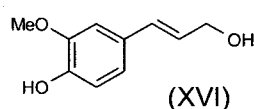
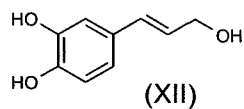
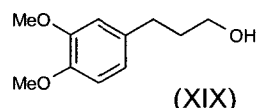
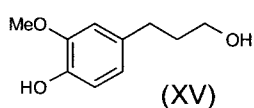
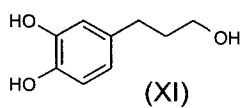
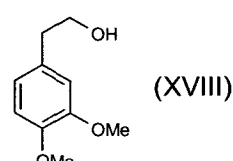
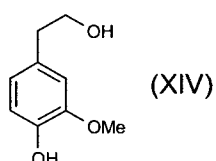
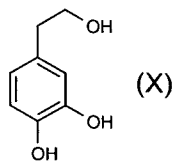
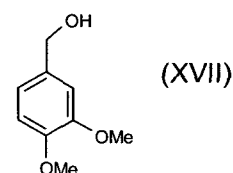
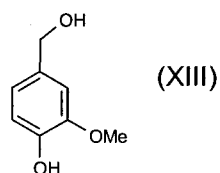
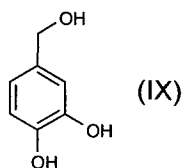
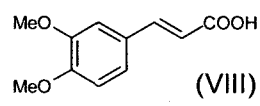
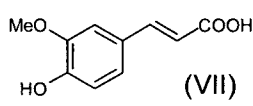
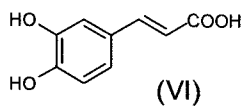
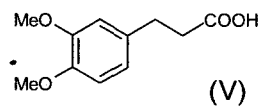
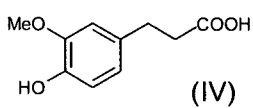
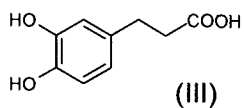
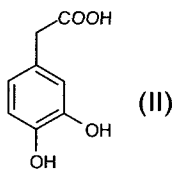
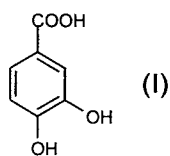
Determinación de la capacidad de captación de radicales libres por el método del radical ABTS.

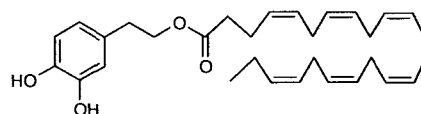
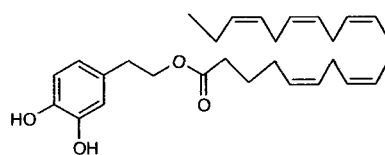
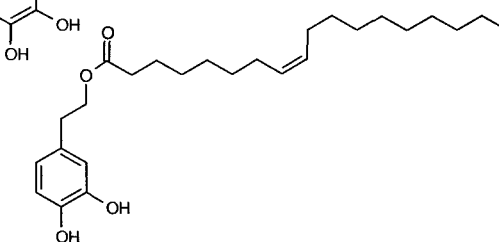
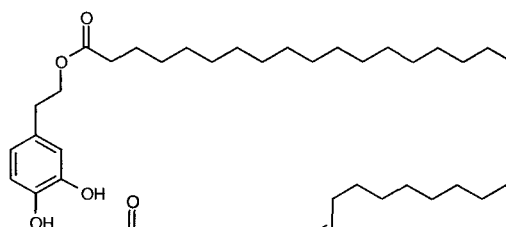
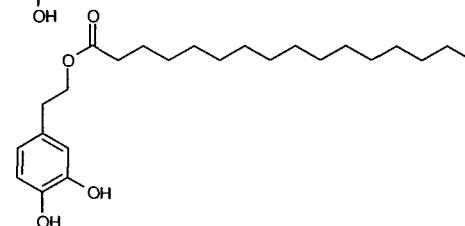
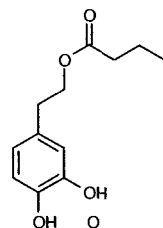
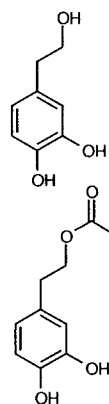
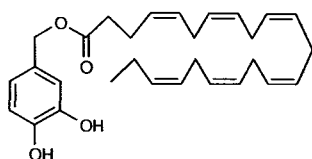
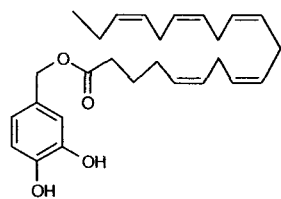
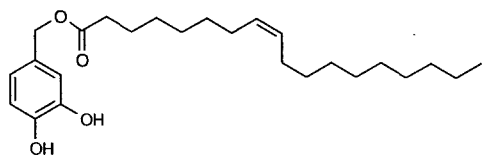
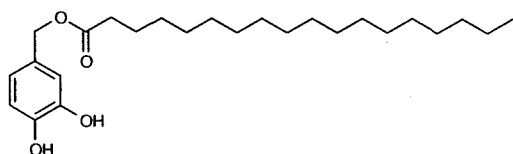
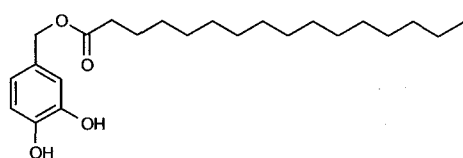
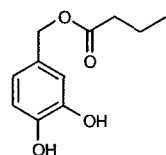
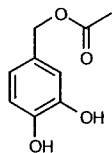
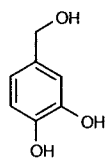
La disolución de trabajo del radical ABTS se preparó previamente haciendo reaccionar 5 mL de una disolución acuosa (Elix) 7 mM de ácido 2,2'-azinobis(6-sulfónico-3-etilbenzotiazolidina), ABTS, con 88 uL de persulfato potásico 140 mM en agua (Elix). La mezcla se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas para que tuviera lugar la formación del radical y posteriormente se diluyó aproximadamente unas 88 veces en etanol HPLC para fijar la absorbancia a 734 nm en 0.7 ± 0.02 . Esta disolución de trabajo no debe usarse después de más de dos días de su preparación.

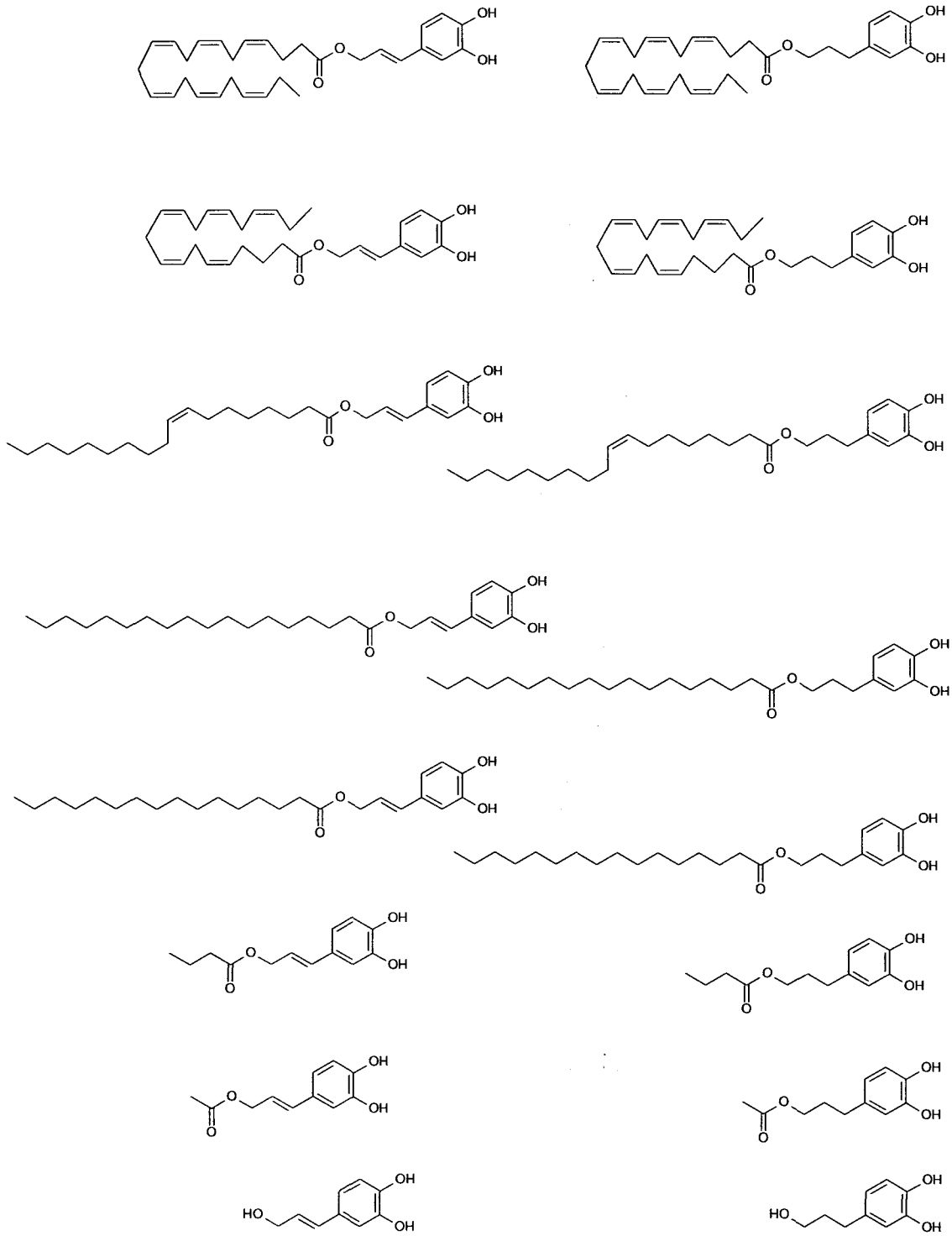
Para la determinación de la capacidad de captación de radicales de los nuevos derivados por el método del ABTS, se añadieron 2 mL de una disolución de la disolución de trabajo, sobre 2 mL de disoluciones de distinta concentración de cada uno de los antioxidantes a ensayar, de forma que las concentraciones finales en la mezcla fueron 0.5, 1, 2, 5 y 10 uM. Cada muestra se agitó vigorosamente durante 30 segundos en Vortex (2500 rpm), y se guardaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos. Utilizando etanol HPLC como blanco y una mezcla de 2 mL de disolución de trabajo de ABTS en 2 mL de etanol HPLC como control, se midió la reducción producida en la absorbancia a 734 nm en cada una de las muestras ensayadas. Cada una de las determinaciones se realizó por triplicado. La capacidad de captación de radicales libres de los nuevos derivados se expresó mediante el valor IC_{50} , (concentración de antioxidante necesaria para reducir al 50% la absorbancia del control de DPPH) y por el % de inhibición de la absorbancia control ($\% \text{ Inhibición} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}] \times 100$), donde A_{control} y A_{muestra} son las absorbancias del control y de la muestra respectivamente). Se representó gráficamente las absorbancias frente a las concentraciones y se obtuvo el valor de IC_{50} por interpolación en la curva. Los antioxidantes comerciales Vitamina C y ascorbil palmitato se usaron como referencia.

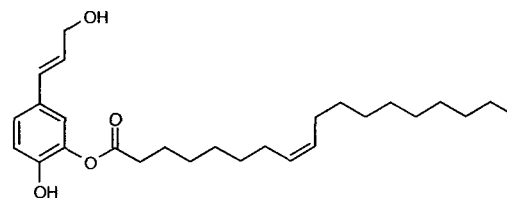
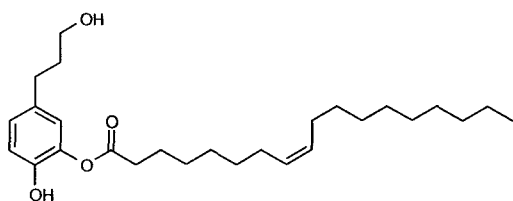
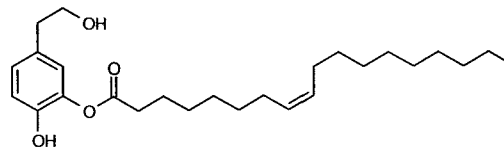
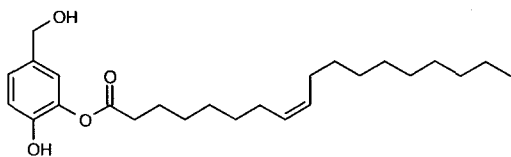
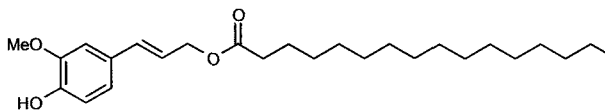
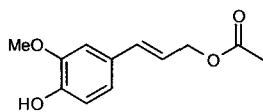
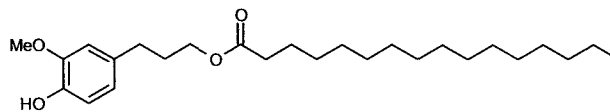
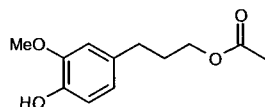
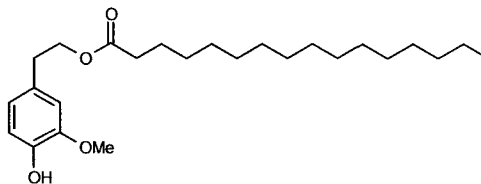
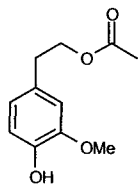
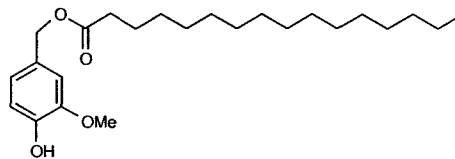
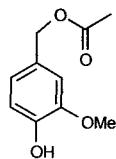
Determinación del coeficiente de partición octanol-agua $\log(P)$.

Para determinar el coeficiente de partición $\log(P)$, se prepararon disoluciones 0.3 mM de cada compuesto en 1-octanol y se calentaron en un baño durante una hora a 60 °C, A continuación, se registró el espectro UV de cada una de las disoluciones y se determinó la absorbancia de cada muestra en su máximo de absorción A_0 . Seguidamente se mezclaron volúmenes iguales (2 mL) de disolución orgánica y de tampón acetato (0.1 M, pH=5.6) o de tampón fosfato (0.1 M, pH=7.4) y se agitaron vigorosamente las muestras en Vortex (2500 rpm) durante 1 minuto. Se dejaron reposar las muestras durante 30 minutos, y a continuación se determinó de nuevo la absorbancia de la fase orgánica en el máximo de absorción, A_x . El coeficiente de partición ($\log(P)$) se calculó a partir de la relación $P=A_x / (A_0 - A_x)$. Como blanco se empleó una disolución de 1-octanol saturado con agua. Los antioxidantes comerciales Vitamina C y ascorbil palmitato se usaron como referencia.









BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA.

Agren J. J., Hanninen, O., Julkunen A. (1996) Fish diet, fish oils and docosahexaenoic acid rich oil lower fasting and postprandial plasma lipids levels. *Eur. J. Clin. Nutr*, 50, 765-771.

Albert C. M., Hennecken`s C. H. O`Donnelly C. J. (1998) Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *J. Am. Med Assoc.*, 279, 23-28.

Allogio, V., Caponio, F., Leonardis, T. (1996) Influenza delle tecniche di preparazione della pasta di olive sulla qualità dell`olio. Nota 1. Profilo quali-quantitativo delle sostanze fenoliche, mediante HPLC, in olio d`oliva vergine della CV ogliarola salentina. *La Rev. Ital. Delle sostanze gras*. Vol. LXXIII, 355-360.

Angerosa, F., D'Alessandro, N., Konstantinou, P, Dibiaccinto, L. (1995) GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1802-1807.

Appel L. J., Miller E. R., Seidler, A. J., Whelton, P. K. (1993) Does supplementation of diet with fish oil reduce blood pressure?. A metaanalysis of controlled clinical trial. *Arch Intern. Med.*, 153, 1429-1438.

Arnao M. B., (2000) Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in food and Techn.*, 11, 419-421.

Arnao, M. B., Acosta, M., Cano, A. (2001) Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.*, 73, 239-244.

Arnao, M. B., Cano, A., Acosta, M. (1999) Methods to measure the antioxidant activity in plant material: A comparative discussion. *Free Radical Research*, 31, S89-S96.

Assmann, G., de Backer, G., Bagnara, S., Fernández-Cruz, A., Varela, G., Williams, C. (1997) International consensus statement on olive oil and the

Mediterranean diet: Implication for health in Europe. *Eur. J. Cancer Prev.*, 6, 418-421.

Auroma O. Z. (1996) Assessment of potential prooxidant and antioxidant action. *JAOCS* 73, 1617.

Auroma O.I. (1993) Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, 9, 20, 523-24.

Auroma, O.L. (1996) Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *JAOCS*, 73, 1617.

Avila, D. V., Ingold, K. U., Luszyk, E. (1995) Dramatic solvent effects on the absolute rate constants for abstraction of the hydroxyl hydrogen atom from tert-butyl hydroperoxide and phenol by the cumyloxyl radical. The role of hydrogen bonding. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 2929-2930.

Bai, C. Nagata, T. (1998) Determination of synthetic hydroxytyrosol in rat plasma by GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* 46,3998-4001.

Bakalbassis, Evangelos G.; Chatzopoulou, Argero; Melissas, Vasilios S.; Tsimidou, Maria; Tsolaki, Matina; Vafiadis, Anastasios. (2001), Ab initio and density function theory studies for the explanation of the antioxidant activity of certain phenolic acids. *Lipids* 36(2), 181-190.

Baraldi, P. G., Simoni, D., Manfredini, S., Menziani, E. (1983) Preparation of 3,4-dihydroxy-1-benzeneethanol: A reinvestigation. *Liebigs Ann. Chem.* 83, 684-686.

Barili, Pier Luigi; Catelani, Giorgio; D'andrea, Felicia; Mastroilli, Ettore. (1997) Efficient differentiation of the hydroxyl groups of 3,4-O-isopropylidene-D-galactopyranosides by lipase catalyzed esterification and de-esterification. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 16(7), 1001-1010.

Bean, J.W. (1964). General effects of oxygen at high tension. In oxygen in the animal organisms. Dickens & E. Neil. Pergamon Press, New York.

Benavente-García, O., Castillo, J., Ortuño, A., Del Río, J.A. (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaeae* L. Leaves. *Food Chem*, 68, 457-462.

Bert, P. (1943) *Barometric pressure: Researches in experimental physiology*, 1878. College Book Co., Columbus, Ohio.

Bianco, A., Passacantill, p., Righ, G. (1998) Improved procedure for the reduction of esters to alcohols by sodium borohydrides. *Synth. Commun*, 18 (15), 1765-1771.

Blake, D.R., Rallen, R.E., Lune, J. (1987) Free radicals in biological systems. A review orientated to inflammatory processes. *Br. Med. Bull.*, 45, 371-385.

Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.

Bonanone, A., Cogran, A., Biffanti, S., Opportuno, A., Sorgato, F., Ursini, F. (1992) Effect of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the susceptibility of plasma LDL to oxidative modification. *Arterioscler. Thromb.*, 12, 524-533.

Borgstrom, G. *Principles of food science* (1968) The MacMillan Co. London.

Boskou, D. (1996) *Olive oil composition, olive oil chemistry and technology* (D. Boskou Ed.) AOCS Press, Champaign.

Braga, C., La Vecchia, C., Franceschi, S., Negri, E., Parpinel, H., Trichopoulos, D. (1998) Olive oil, other seasoning fats and risk of colorectal carcinoma. *Cancer*, 82, 448-453.

Brand-Willians, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Used free radicals method to evaluate antioxidant activity, *Ibid.* 28, 25-30.

Brenes, Manuel; Garcia, Aranzazu; Garcia, Pedro; Rios, Jose J.; Garrido, Antonio (1999). Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3535-3540.

British Pharmaceutical Codex, 11th edition, (1979), The pharmaceutical Press, London, U.K.

Buisman, G. J. H.; Van Helteren, C. T. W.; Kramer, G. F. H.; Veldsink, J. W.; Derksen, J. T. P.; Cuperus, F. P. (1998), Enzymic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnology Letters* 20(2), 131-136.

Cano, A., Acosta, M., Arnao, M. B. (2000) A method to measure the antioxidant activity in organic media. Application to lipophilic vitamins. *Redox Report*, 5, 365-370.

Capasso, R., Evidente, A., Avolio, S., Solla, F. (1999) A Highly convenient synthesis of hydroxytyrosol and its recovery from agricultural waste water. *J. Agric. Food Chem*, 47, 1745-1748

Capasso, R., Evidente, A., Visca, C., Gianfreda, L., Maremonti, M., Greco, G. (1996) Production of glucose and bioactive aglicone by chemical and enzymatic hydrolysis of purified oleuropein from *olea europaea*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 60, 365-377.

Cert. A., Mateos, R., Espartero, J.L., Trujillo, M., León-Camacho, M., Alandia, F. (2001) Determination of phenols, flavones and lignans in virgin olive oil by solid-phase extraction and HPLC-DAD. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2185-2192.

Cerutti, P.A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 227, 375-81.

Chan, M.W.S. (1987) The mechanism of autooxidation of lipids. *Autooxidation of unsaturated lipids*. Academic Press, London.

Chen, Z.Y., Chan, P.T., Ma, H.M., Fung, K.P: (1996) Antioxidative effect of ethanol tea extracts on oxidation of canola oil. *JAOCS*, 736,375.

Colguhoun, D.M., Hieks., B.J., Reed, A.W. (1996) Phenolic content of olive oil is reduced in extraction and refining. *J. Clin. Nutr.*, 5, 105.

Coner, E.M., Grisham, M.B. (1996) Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 12, 274-277.

Coni, E., Di Benedetto, R., Di pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Carlini, E.A. (2000) Protective effect of oleuropein on olive oil biophenol on LDL oxidizability in rabbits. *Lipids*, 35, 1, 45-54.

Cortesi, N.; Azzolini, M.; Rovellini, P. (1995) Determination of minor polar components in virgin olive oils. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 72(8), 333-7.

Crea, R. (2002) Method of obtaining a hydroxytyrosol-rich composition from vegetation water. PCT int. Appl. WO 0218310 A1.

Cuvelier. M. E., Richard, H., Berset, C. (1992) Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationships. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 56, 324-325.

D'Angelo, Stefania; Manna, Caterina; Migliardi, Valentina; Mazzoni, Orazio; Morrica, Patrizia; Capasso, Giovanni; Pontoni, Gabriele; Galletti, Patrizia; Zappia, Vincenzo. (2001) Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabolism and Disposition*, 29(11), 1492-1498.

Danieli, Bruno; Luisetti, Monica; Riva, Sergio; Bertinotti, Anna; Ragg, Enzo; Scaglioni, Leonardo; Bombardelli, Ezio. (1995) Regioselective Enzyme-Mediated Acylation of Polyhydroxy Natural Compounds. A Remarkable, Highly Efficient Preparation of 6'-Acetyl and 6'-O-Carboxyacetyl Ginsenoside Rg1. *Journal of Organic Chemistry*, 60(12), 3637-42.

Danieli, Bruno; Luisetti, Monica; Sampognaro, Giannantonio; Carrea, Giacomo; Riva, Sergio. (1997), Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 3(1-4), 193-201.

Danieli, Bruno; Riva, Sergio (1994), Enzyme-mediated regioselective acylation of polyhydroxylated natural products. *Pure and Applied Chemistry* 66(10/11), 2215-18.

De Duve, Ch. (1969), The peroxysome: a new cytoplasmatic organelle. *Proc. R. Soc. London. Ser. B.*, 173, 710-723.

Demple, B. (1990) Oxidative DNA damage: repair and inducible cellular responses. *Mutat. Environ, A*, 155-167.

Di Luzio, N. R. (1967), The employment of antioxidant in the prevention and treatment of experimental liver injury. *Prog. Bio-chem. pharmacol*, 3, 325-332.

Diack, M., Saske, M. (1995) Separation of vitamin E and g orizanol from rice bran by normal phase chromatography. *JAOCS*, 71, 1211.

Díaz, M.N., Frei, B. (1997) Antioxidant and atherosclerosis Heart disease. *N. Engl. J. Med.* 337, 408-416.

Dillard, C.J., Gavino, V.C. Tappel N.L. (1983) Relative antioxidant effectiveness of α -tocopherol and γ -tocopherol in iron loaded rat. *J. Nutr.* 113, 2266

Drauz, K., Waldmann, H. (eds), (1995) *Enzyme catalysis in organic synthesis*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Basel, Cambridge, New York.

Dugan, L.R. (1980). Natural antioxidant. In autooxidation in food and biological system. Plenum Press, New York, 261-295.

Dugo, G. Saitta, M., Bambara, G.(2001) Characterizatio of Sicilian wines. Note 1. Detgermination of phenolic compounds in Sicilian red wines by a HRGC-MSMS System. *Vignevini*, 28 (10) 81-85.

Duh, P.D., Yeh, D.B., Yer, G.C. (1992) Extraction and identification of an antioxidative component from peanut hulls. *JAOCS*, 69, 814.

Duve, K.J., White, P.J. (1991) Extractio and identification of antioxidants in oats. *JAOCS*, 68, 365.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Relative antioxidant effectiveness

14 ENE. 2004

COMISION DE DOCTORADO

Dziedric, S. Z., Hudson, B. J. F., (1984) Phenolic acids and related compounds as antioxidant for edible oils. *Food Chem*, 14, 45-51

Elliot, J.G. (1999) Application of antioxidant vitamins in food and beverages. *Food Technol.*, 53, 46-48.

Emerit, I., Levy, A., Asriam, K. (1995), Radiation induced clastogenic factors: anticlastogenic effect of Ginkgo biloba extract. *Free Radical Biol. Med.* 18 (6), 985-991.

Espin, J.C., Soler Rivas, C., Cantos, E., Tomás-Barberán, F.A., Wichers, H.J. (2001) Síntesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1187-1193.

Evans, N. M., Bishop, K.S., (1922), On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*, 56, 650-657.

Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillén, R., Jiménez, A. Guillén, R., Jiménez, A. (2002) Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two—phase olive oil processing on "alperujo". *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6804-6811.

Flohe, L. Gunzler, W. A., Schook, H.H. (1973), Glutathione peroxidase a seleno enzymes. *FEBS lett.* 32, 132-138.

Frankel, E. N., Huang, S. W. (1996) Evaluation of antioxidant activity of rosemary extract, carnosol and carnosic acid, in bulk vegetable oils and fish oils and their emulsion. *J. Sci. Food Agric.* 72, 201-208.

Frankel, E. N., Huang, S. W., Aeschbach, R., Prior, A. (1996) Antioxidant activity of rosemary extract and its constituents carnosol carnosic acid and rosemarinic acid, in bulk oils and oil-in-water emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 44, 131-135.

Frankel, E. N., Huang, S. W., Kanner, J., German J. B. (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidant: bulk oils vs emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1054-1059.

Frankel, N. E., Meyer, S. A. (2000). The problems using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidant. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1925-1941.

Freeman, B.A., Grapo, J.D. (1982) *Biology of disease. Free radicals and tissue injury. Lab. Invest.*, 47, 412-426.

Freis, B. (1994) *Natural antioxidant in human health and disease. Academic Press, San Diego.*

Gallagher, C. (1961), Protection by antioxidant against lethal doses of carbon tetrachloride. *Nature*, 192, 881-886.

Galliard, T., Chan, H.W. (1980) in *Biochemistry of plants*, vol 4, 131, Academic Press, New York.

Gardner, H.W. (1996) Lipoxygenase as a versatile biocatalyst. *JAOCS*, 73 1347.

Gebicki, S., Gebicki, J.M. (1993) Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem. J.*, 289, 743-49.

Gerschman, R. (1962) Man's dependence on the earthly atmosphere. 1st Int. Symp. Submarine and space medicine. Ed. K.S. Schaeffer, New York, 475-484.

Godber, S.J., Xu, Z. (1999) Purification and identification of components of g-oryzanol in rice bran oil. *J. Agric. Food Chem. Vol. 47, 7, 2724-28.*

Gómez-Alonso, S, Fregapane, G., (2002) Phenolic compound profile of cornicabra virgin olive oil. *J Agric. Food. Chem.*, 50, 6812-6817.

Gómez-Alonso, S, Fregapane, G., Gordon M. H. (2003) Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying. *J Agric. Food Chem.*, 51, 667-672.

Gordon, M. H., Pavia-Martin, F., Almeida, M. (2001) Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J Agric Food Chem*, 49, 2480-2485.

- Graf, E. (1992) Antioxidant potencial of ferulic acid. *Free radicals biol. Med.*, 13,435-448
- Gray, L.H., Scott, O.C.A. (1964) Oxygen tension and the radio sensitivity of tumours. In *oxygen in the animal organisms*. Dickens & E. Neil. Pergamon Press, New York, 537-561.
- Grosch, W. (1987) Reactions of hydroperoxides-products of low molecular weight. *Autoxidation of unsaturated lipids*. Academic Press, London.
- Halliwell, B., Aruoma, O.I. (1993) *DNA and free radicals*. Ellis Horwood, N.Y.
- Halliwell, B., Chirico, S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57 (3) 715S-722S.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1985) The importance of free radicals and catalytic metals in human diseases. *Molec. Aspects Med.* 8, 189-193.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1999) *Free radicals in biology and medicine*. 3rd Edition. New York, Oxford University Press.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E. (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *Lab. Clin. Med.*, 19 (6), 598-620.
- Harborne, J.B. (1989) In: *Methods in plant biochemistry I: plant phenolics*. Academic Press, London.
- Harborne, J.B. (1993) In: *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman and Hall, London.
- Hardman, K. (1992) Role of free radicals in aging and disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA*, 673, 126-141.
- Harman, D. (1962), Role of free radical in mutation, cancer, aging and maintenance of life. *Diabet. Res.* 16, 753-763.
- Harman, D. (1978). Free radical theory of aging: nutritional implication. *Age*, 1, 145-153.

Harman, D. (1986), Free radical theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging and diseases processes. Free radical, aging and degenerative diseases. New York, 3-24.

Haslam E., (1980) Recent developments in methods for the esterification and protection of the carboxil groups. Tetrahedron, 36, 2409.

Haslam, E. (1979) Activation and protection of the carboxil groups. Chem. Int, 610.

Hollman, P.C., Katan, M. B. (1997) Absorption, metabolism and healths effects of dietary flavonoids in man. Biomed. Pharmacothec. 51(8), 305-10.

Hotta, H. H., Sakamoto, S., Nagano, T., Tsujino, Y. (2001) Unusually large number of electrons for the oxidation of phenolics antioxidant, Biochim. Biophys. Acta 1526, 159-167.

Huang, S. W., Hopia, A. I., Frankel, N. E., German J. B. (1996) Antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsion, Ibid., 44, 444-452.

Hudson, J.F. (1990) Food antioxidant. Elsevier Applied Science. London.

Humeau, C.; Girardin, M.; Coulon, D.; Miclo, A. (1995), Synthesis of 6-O-palmitoyl L-ascorbic acid catalyzed by *Candida antarctica* lipase. Biotechnology Letters 17(10), 1091-4.

Humeau, C.; Girardin, M.; Rovel, B.; Miclo, A. (1998), Enzymic synthesis of fatty acid ascorbyl esters. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 5(1-4), 19-23.

Humeau, C.; Rovel, B.; Girardin, M. (2000), Enzymatic esterification of bixin by L-ascorbic acid. Biotechnology Letters 22(2), 165-168.

Illi, V. O. (1979) Phase transfer catalyzed acylation. Tetrahedron Letters, 26, 2431-2432.

- Junzo O. (1998) Preparation of vitamin A or their carboxylic acid esters. JP 96-318491.
- Jurdi-Halderman, D., MacNeil, J.H., Yared, D.M. (1987) Antioxidant activity of anion and garlic juices in stored cooked ground lamb. *J. Food Prot.*, 50, 411.
- Kamal-Eldin A., Appelquist, L. (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 671-701.
- Kandler, O. and Sironval, O. (1959), *Biochim. biophys. acta*, 33, 207.
- Karoum, F., Sandler, M. (1971) GC assay of phenolics alcohols in biological material using electron capture detecton. *Biochemical Medicine* 5 (6) 505-14.
- Kasuga, A., Ayonagi, Y. Sugahara, T. (1988) Antioxidant activities of edible plants. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 35, 828.
- Keññard, B., Kinderlerer, J.L. (1985) Volatile off-flavour compounds in desiccated coconut. *J. Sci. Food Agr.*, 36, 415.
- Keys A. (1970) coronary heart disease in seven countries. *Circulation*, 44 (suppl. 4) 163-175.
- Kikuyawa, K., Kunuyi, A. (1990) Chemistry and implication of degradation of phenolic antioxidants. *Food Antioxidant*, Elsevier, Barking.
- Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B., Kamer, J. (1993) Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, 85-89.
- Kitts, D.D. (1997) An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 198-203.
- Kourimska, L., Pokony, J. (1993) The antioxidant activity of 2,6-dimethyl-3,5-diethoxy-carbonyl-1,4-dihydropyridine in edible oils. *Nahrung*, 37, 91.
- Kurt K., Bayonne N. (1948) Esterification with acid anhydrides and acid chlorides, *American perfumer and essential oil*, vol. 51.

- Larson, R.A., 1988. The antioxidant of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969-978.
- Lee, Chang Yong; Kim, Dae-Ok; Lee, Ki Won; Lee, Hyong Joo; (2002),. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(13), 3713-3717.
- Lee, M.J., Wang, Z.Y., Li, H., Chen, L., Yang, C.S. (1995) Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomark Prev.*, 4, 393-399.
- Lee, S.H., Min, D.B. (1990) Effects, quenching mechanisms, and kinetics of carotenoids in chlorophyll sensitized photooxidation of soybean oil. *J. Agr. Food Chem.*, 38, 1630.
- Lesage-Meessen, L.; Navarro, D.; Maunier, S.; Sigoillot, J-C.; Lorquin, J.; Delattre, M.; Simon, J-L.; Asther, M.; Labat, M. (2001) Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75(4), 501-507.
- Lewis, B. A., Son, S. (2002) Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 468-472.
- Lunec, J. (1992) Free radicals; their involvement in disease processes. *Biochim. Clin.* 16(2) 99-108.
- Manna, C., Gulletti, P., Maisto, G., Zappia, V. (2000) Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in caco-2-cells. *FEBS Lett*, 470, 341-344.
- March, J. (1992) *Advanced organic chemistry. Reactions mechanisms and structure* 4th edition, John Wiley and Son, pages. 362-365, 392-397.
- Mariana, L., Bellan, G. (1996) Sulla presenza di tocoferoli, diidrotocoferoli, tocodienoli, tocotrienoli negli oli-vegetabili. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, 73, 533.

Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V. (1992) On the activity of ascorbyl palmitate during the autoxidation of two types of lipid system in the presence of α -tocopherol. *Fat Sci. Technol.* 94, 448.

Marsilio, V., Lanza, B., Poxxi, N. (1996) Progress in table olive debittering: Degradation in vitro of oleuropein and its derivatives by lactobacillus P. *JAOCS*, 73 (5) 593-97.

Martínez-Cayuela, M. (1998) Xenobiotic toxicity mediated by oxygen free radicals. *Ars Pharmaceutica*, 39:1, 5-18.

Martín-Moreno, J.M. (1994) Willet, W.C., Gorgojo, L., Benegas, J.R., Rodríguez-Artalejo, Boyle, P. (1994) Dietary fat olive oil intake and breast cancer risk. *Int. J. Cancer*, 58, 774-778.

Mathews, Van Holde. *Biochemistry* (2nd Edition) 1996

Mc Elhanney R. N., Lewis R. N. A., Foht, P. J., Tran Q. M., Cheng, X. L. (2002) The biosynthetic incorporation of short-chain linear saturated fatty acids may suppress cell growth by perturbing membrane lipid polar head groups distribution. *Biochem*, 41, 8665-8671.

McClements, D. J., Decker, E. A., (2000) Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J. Food Sci.* 65, 1270-1282

McCord, J.M., Fridovich, L. (1968), The reduction of cytochrome by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem*, 243, 5753-5760.

Michaelis, L. (1949), Fundamental principles in oxido-reductions. *Biol. Bull*, 92, 2939-50.

Miller N. J., Rice-Evans, C. A. (1997) Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS^{•+} radical cation assay. *Free Radical Research*, 26, 195-199.

Miquel, J. (1989), Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. Handbook of free radicals and antioxidant in medicine. Vol 1, CRC Press, Boca Raton, Fla., 3-13.

Mittenberg, W., Seidenberg, M. (1989) Changes in cerebral functioning associated with normal aging. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 11, 918-932.

Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M. (1992) Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3535-3540.

Montedoro, G.F., Garofalo, L. (1984) Caratteristiche quantitative degli oli vergini di olive. Influenza di alcune variabili: varietà, ambiente, conservazione, estrazione, condizionamento del prodotto finito. *Riv. Ital. Sostanz. Gras*, 61, 157-168.

Moreau, Ch., Dufraise, C. (1924). Autooxydation et action antioxiogene. Proprietes catalytiques du soufre et de ses composés IX, *C.R. Acad. Sci.* 178, 612-618.

Muggli, R. (1993) Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients in: free radicals and antioxidant in nutrition. Pg 189-204. Richelieu Press. London, UK.

Mulinacci, N.; Romani, A.; Galardi, C.; Pinelli, P.; Giaccherini, C.; Vincieri, F. F. (2001) Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3509-3514.

Mulliken, R.S. (1929), Interpretation of the atmospheric absorption bands of oxygen. *Physiol. Rev*, 32, 880-898.

Murad, S., Grove, D., Pinnell, S.R. (1981) Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78, 2879-2882.

Naketani, N. (1994) Antioxidant and antimicrobial constituents of herbs and spices. Elsevier, Amsterdam.

Namiki, M. (1988) Chemistry of Maillard reactions: Recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Adv. Food Res*, 32, 115-184.

Nicoli, M.; Anese, M.; Parpinel, M.; Franceschi, S; Lericci, C. (1997). Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer Lett.* 71-74.

Niki, E., Noguchi, H., Gotoh, N. (1995) Interaction among vitamin C, vitamin E and β -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1322S.

Nissiotis Michalis, Tasioula-Margari, M. (2002) Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation. *Food Chem.*, 73, (3) 371-376.

Nucci, R., Briante, R., La Cara, F., Febbraio, F., Barone, R. (2000) Hydrolysis of oleuropein by recombinant β -glycosidase from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* immobilised on chitosan matrix. *Journal of Biotechnology*, 77, 275-286.

O'Brien, R.J. (1997) Oxidation of lipids in biological membranes and intracellular consequences. "Antioxidation of unsaturated lipids"- Academic Press. London, pg 233.

O'Brien, J.; Morrissey, P. A. (1989) Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 28, 211-248.

Omural, K. (1993) Antioxidant synergism between BHA and BHT. *JAOCS*, 72, 1505.

Owen, R. W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. (2000) Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*, 38(8), 647-659.

Papadopoulos, G., Boskou, D. (1991) Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68(9) 669-71.

Pekkarinen, S. S., Stockmann, H., Schwarz, K., Heinonen, I. M., Hopia, A. I. (1999) Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *J Agric. Food Chem.*, 47, 3036-3043.

Pellegrini, Nicoletta; Re, Roberta; Proteggente, Anna; Pannala, Ananth; Yang, Min; Rice-Evans, Catherine. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26(9/10), 1231-1237.

Pfeuin, J.I. (1992) Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive. *Revue Franc. des corps gras*, 39, 25-32.

Phelps, S., Harris, W.S. (1973) Garlic supplementation and lipoprotein oxidation susceptibility. *Lipids*, 28, 475.

Pirisi, Filippo M.; Angioni, Alberto; Cabras, Paolo; Garau, Vincenzo L.; Sanjust di Teulada, Maria Teresa; Karim dos Santos, Marlene; Bandino, Giovanni. (1997) Phenolic compounds in virgin olive oils. I. Low-wavelength quantitative determination of complex phenols by high-performance liquid chromatography under isocratic elution. *Journal of Chromatography, A*, 768(2), 207-213.

Pirisi, Filippo M.; Cabras, Paolo; Cao, Clara Falqui; Migliorini, Marzia; Muggelli, Marco (2000). Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Reappraisal of the Extraction, HPLC Separation, and Quantification Procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1191-1196.

Planas, J.M., Ruiz-Gutiérrez, M., Cert, A., (2000) Determination of hydroxytyrosol in plasma by HPLC. *Anal. Chem.*, 72, 4458-61.

Pokorny, J. (1987) Major factors affecting the autoxidation of lipids. *Autoxidation of unsaturated lipids*. Academic Press, London.

Pokorný, J. (1990) *Fats, oils and other lipids. Chemical changes during food processing*. Elsevier, Amsterdam.

Pokorny, J. (1999) Antioxidant in food preservation. In *Handbook of food preservation*. Marcel Dekker, Inc., New York Press.

- Pokorny, S. (1991) Natural antioxidant for food use. *Trends Food Sci. Technol.*, 2, 223.
- Porter, N.A., Mills, K.A. (1995) Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30, 277.
- Pospíšil, J. (1989) Antioxidant and related stabilities. Oxidation inhibition in organic material. CRS Press (Pospíšil & Keinchuk eds.)
- Pratt, D.E. (1980) Natural antioxidant from soybeans and other oilseeds. In: *Autooxidation of food and biological system*. Plenum Press. New York.
- Pryor W.A., Church, D.P. (1991) Aldehydes, hydrogen peroxide and organic radical as mediators of oxygen toxicity. *Free Rad. Biol. Chem.*, 11, 41-46.
- Pryor, W.A. (1986) Oxi-radicals and related species. Their formation, life-times, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.*, 48, 657-667.
- Przybylski, R., Eskim, N.A.M. (1995) Methods to measure volatile compounds and the flavour significance of volatile compounds. In *Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods*. AOCS Press, Champaign. Pg 107.
- Raccachi, M. (1984) The antimicrobial activity of phenolic antioxidants in foods. *J. Food Safety*, 6, 141.
- Rahman, M.S. (1999) *Handbook of food preservation*. Marcel Dekker, Inc. New York. Basel.
- Ramírez-Tortosa, M.C., Aguilera, C.M., Quiles, J.L., Gil, A. Influence of dietary lipids on lipoprotein composition and LDL Cu²⁺ induced oxidation in rabbits with experimental atherosclerosis. *Biofactors*, 8, 71-85.
- Reaven, P., Panthasarathy, S., Grasse, B.J., Witztum, J.L. (1991) Feasibility of using oleate rich diet to reduce the susceptibility of LDL to oxidative modification in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54, 701-706.
- Reitz, R.A. (1975). A possible mechanism for the peroxidation of lipids due chronic ethanol ingestion. *Biochim. Biophys. Acta*, 380, 145-143.

Rice-Evans, A. C., Miller, N. J. (1996), Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolics acids. *Free radicals Biol. Med.* 20, 933-956.

Riva, Sergio; Danieli, Bruno; Luisetti, Monica. (1996) A Two-Step Efficient Chemo-enzymic Synthesis of Flavonoid Glycoside Malonates. *Journal of Natural Products*, 59(6), 618-621.

Rojas-Hidalgo, E. (1996) *Vitaminas y acción antioxidante*. Editado por Merck.

Sagrasta, A.F., García, M.A., de Madariaga, M. (2002) Antioxidant and pre-oxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation. *Free Radical Res.* 36, 329-40.

Saija, A., Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella N., (1999) On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.*, 51, 971-974

Saija, Antonella; Trombetta, Domenico; Tomaino, Antonio; Lo Cascio, Rossella; Princi, Pietro; Uccella, Nicola; Bonina, Francesco; Castelli, Francesco. (1998), 'In vitro' evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. *International Journal of Pharmaceutics* 166(2), 123-133.

Santrucek, M., Krepelka, J. (1988), Antioxidant, potential chemotherapeutics agents. *Drugs of the future*, 13 (10), 974-996.

Scanlon, A., Sather, A., Day, E.A. (1965) Contribution of free fatty acids to the flavour of rancid milk. *J. Dairy Sci.*, 48, 1582.

Scanlon, A., Sather, L.A., Day, E.A. (1965) Contribution of free fatty acids to the flavour of rancid milk. *J. Dairy Sci.* 48:1582.

Schildermann, R.A., Ten-Hoor, F., Kleinjas, J.C.S. (1995) Induction of oxidative DNA Damage and early lesions in rat gastrointestinal epithelium in relation to prostaglandin H synthase-mediated metabolism of BHA. *Food Chem. Toxicol.* 33, 99-109.

Schöpf, C., Göttmann, G., Meisel E. M. (1949) Über β -(3,4-dioxyphenyl)-äthylalkohol. Liebigs Ann. Chem., 563, 86-93.

Schwarz, K., Frankel, E. N., German J. B. (1996) Partition behaviour of antioxidant phenolics compounds in heterophasic system. Fett/Lipid, 3, 115-121.

Shahidi, F., Amarowicz, R., Abou-Gharbia, H.A., Shehata, A.A.Y. (1997) Endogenous antioxidants and stability of sesame oil as affected by pressing and storage. JAOCS, 74, 143.

Shen, J. G. (1995) Zhao, B.L., Li, M.F. (1996) Inhibitory effects of Ginkgko biloba extract on oxygen free radicals, nitric oxide, and myocardial injury in isolated isohemic hearts. Proc. Int. Symp. Natural Antioxidants AOCS Press, Champaign.

Silva, F.A.M., Borges, F., Guimaraes, C., Lima, F.C., Matos, C., Reis, S. (2000) Phenolics acids and derivatives: studies on the relationships among structure, radicals scavenging activity, and phisicochemical parameters. J. Agric. Food Chem., 48, 2122-2126.

Singh, R.P. (1994) Scientific principles of shelf live evaluation in shelf life evaluation of foods. Blackie Academic and professional. Glasgow. Pg 3-24.

Sjodim, B. Hellsten Wesling, Y., Apple, F. S. (1990) Biochemical mechanisms for oxigen free radical formation during exercise. Sports Med. 10:236-239.

Sohal, R.S., Sohal, B.H., Orr, W.C. (1995) Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species os flies. Free Radic. Biol. Med., 19:499-500.

Soleas G. J.; Goldberg D. M. (1997), A multiresidue derivatization gas chromatographic assay for fifteen phenolic constituents with mas selective detection. Anal. Chem., 69, 4405-4409.

Soler-Rivas, C., Espin, J.C., Wichers, H. (2000) Oleuropein and related compounds. J. Sci. Food Agric., 80, 1013-1023.

Southorn, P.A. Powis, G. (1988) Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reaction. *Nayo Clin Proc.*, 69, 381-389.

Southorn, P.A., Powis, G. (1988) Free radicals in Medicine (I&II) *Mayo Clin. Proc.* 63, 389-408.

Steglich W., Neises B. (1978) Simple method for the esterification of carboxilic acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 17, nº 7.

Steinberg, D. (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 272, 34, 20963-66

Stepanik, T.M., Ewing, D.D. (1993) Isolation of glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase of human erythrocytes. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 20, 157-69.

Sturino C. F., Labelle M. (1998) A convenient method for the preparation of acylsulfonamide libraries. *Tetrahedron Letters*, 39, 5891-5894.

Teramura, A.H. (1983) *Physiol. Plant*, 58, 415.

Terao, J., Karasawa, H., Arai, H., Nagao, A., Suzuki, T., Takama, K. (1993) Peroxyl radical activity of caffeic acid and its related phenolic compounds in solution. *Biosci. biotechnol. biochem.*, 57, 1204-1205.

Tolbert, B.M., Downing, M., Baker, E.M. (1975) Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbate sulfate. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 258, 48-69.

Tommaso, D., Domenico, R. (1998) Identification and quantification of hydroxytyrosol in Italian wines. *J. High resol. Chromat.* 21 (10) 549-53.

Troszyńska, A., Bednarska, A., Latosz, A. (1997) Polyphenolic compounds in the seed coat of legume seeds. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 6, 37.

Tsimidou, M., Nenadis, N., Boyle, S., Bakalbassis, E. G., (2003) An experimental approach to structure-activity relationships of caffeic and dihydrocaffeic acids and related monophenols. *JAOCS*, 80, 5, 451-458.

- Tsimidou, M., Papadipoulos, G., Boskou, D. (1991) Phenolic compounds and stability of virgin olive oil.-Part I. *Food Chem.*, 45, 141-144.
- Tsimidou, M.; Papadopoulos, G.; Boskou, D. (1992) Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chemistry*, 44(1), 53-60.
- Tsimidou, Maria Z. Nenadis, Nikolaos; Zhang, Hong-Yu; (2003) (2), Structure-Antioxidant Activity Relationship of Ferulic Acid Derivatives: Effect of Carbon Side Chain Characteristic Groups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(7), 1874-1879.
- Tsimidou, Maria, Nenadis, Nikolaos; (2002) Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) tests. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79(12), 1191-1195.
- Tuck, K. L., Tan H-W, Haybal, P. J. (2000) Synthesis of tritium labeled hydroxytyrosol, a phenolic compound found in olive oil. *J Agric. Food Chem*, 48, 4087-4090.
- Tuck, Kellie L.; Hayball, Peter J.; Stupans, Ieva. (2002) Structural Characterization of the Metabolites of Hydroxytyrosol, the Principal Phenolic Component in Olive Oil, in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2404-2409.
- Urquiaga, I., Urzúa, U., Leighton, F. (1999) Antioxidantes Naturales. Impacto en la salud. 8º Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites. Octubre, 1999.
- Vaes, W. H., J., Ramos, E. U., Verhaar, H. J. M., Cramer, C. J., Hermens, J.L.M. (1998) Understanding and estimating membrane/ water partition coefficients: Approaches to derive quantitative structure property relationships. *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 847-854.
- Verhe, R., Papadopoulos, G., Boskou, D. (1992) *Bull. Liason Groupe polyphenols*, 15, 237-244.

- Vichnevetskaia, K. D., Roy D. N. (1999), *Environ. Rev.* 7, 31-51.
- Visioli, F., Bellomo, G., Galli, C., (1998) Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 247, 60-64.
- Visioli, F., Borsani, L., Galli, C. (2000) Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovascular Research*, 47, 419-425.
- Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Galli, G., Carusso, D. (2000) Olive oil phenolics are dose dependently absorbed in humans. *FEBS Lett.*, 468, 159-160.
- Visioli, F., Galli, C., Caruso, D. (2000) Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *Febs letters*, 468, 156-160.
- Visioli, F., Romani, A., Vincieri, F.F., Galli, C. (1999) Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3397-01.
- Visioli, F., Salami, M., Galli, C., De Angelis, L. (1995) Formation of F₂-isoprostanes in oxidized LDL inhibitory effect of hydroxytyrosol. *Pharmacological Research*, 31, 5, 275-79.
- Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Galli, G., Carusso, D. (2000) Olive oil are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett.*, 468, 159-160.
- Vulfson, Evgeny N, Gao, Chunli; Whitcombe, Michael J.(1999), Enzymatic synthesis of dimeric and trimeric sugar-fatty acid esters. *Enzyme and Microbial Technology* 25(3-5), 264-270.
- Warner, K. (1995) Sensory evaluation of oils and fats containing foods. In *Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods*. AOCS Press, Champaign. Pg 49-53.
- Whittem, C.C., Miller, E.E., Pratt, D.E. (1984) Cottonseed flavonoids as lipid antioxidant. *JAOCS*, 61, 1075.

Wolff, S.P., Dean R.T. (1986) Fragmentation of protein by free radicals lipids and protein degradation. *Trends Biochem. Sci.*, 11, 27-31.

Yaqood, Knappe, J.A., Calda, P.C. (1998) Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 67, 129-35.

YoshiKawa, T., Toyokimi, S., Yamamoto, Y., Naito, Y. (2000) Free radicals in chemistry and Medicine. OICA International London.

Zadernowski, R., Nowal-Palakowska, H., Losow, B. (1995) Natural antioxidant in seeds of plant species. *Acta Acad. Scii. Techn. Olsten*, 27, 107.