



NITROALQUENOS Y NITROALCANOS AROMÁTICOS COMO POTENCIALES AGENTES ANTIOXIDANTES

Nicolás Cataldo

Tutoras:

**Dra. Leonor Thomson, Dra. Mercedes González
Facultad de Ciencias, Universidad de la República**

Montevideo, Octubre 2013

❖ **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero agradecerles a mis tutoras Leonor Thomson y Mercedes González por recibirme e integrarme en sus grupos de trabajo, por sus enseñanzas y por permitirme realizar la tesis haciéndome sentir muy cómodo en el ámbito del laboratorio.

Quisiera agradecerles también a todos mis compañeros/as de enzimología y orgánica, tanto por sus colaboraciones, como por formar parte de un ambiente de trabajo muy agradable.

Quiero agradecerles muy especialmente a mis amigos/as de facu: Rodo, Rouz, Marquito, Flor, Tincho, Sabri, Pablito, Bibi, Mati, Lila, Mauri, Mara, Guille, Ceci, Seba y Matilde, así como a los de toda la vida: Magda y Diego. Todos ellos saben cuán importante fueron para mí todo este tiempo.

Por último quiero agradecerle a mi familia, por toda la confianza depositada, dándome siempre para adelante con la carrera, pasando tantos nervios o quizás más que yo durante todos estos años esperando mi recibimiento.

❖ Resumen

La búsqueda de agentes antioxidantes es de gran relevancia a nivel farmacológico, dado que el estrés oxidativo afecta a diversas enfermedades, tales como la aterosclerosis o la artritis reumatoidea. Existen descripciones previas de nuestro grupo, de nitroalquenos aromáticos de gran diversidad estructural, que poseen buena capacidad antioxidante. En este trabajo se sintetizaron 5 nitroalquenos y 4 nitroalcanos derivados, para el estudio de sus propiedades antioxidantes. Los primeros fueron obtenidos mediante condensación nitroaldólica, mientras que los segundos se obtuvieron por posterior reducción de las primeras. Como reactivos de partida fueron utilizados 4-metilbencaldehído, 4-dimetilaminobenzaldehído, 4-acetamidobenzaldehído y 2-quinolincarboxialdehído. Las reacciones se desarrollaron con buenos rendimientos, y sus productos fueron completamente caracterizados por RMN de protón y de carbono trece. La capacidad antioxidante de los compuestos nitroalifáticos, medida por ORAC, mostró que los derivados metiltio fueron un 50% más efectivos que Trolox para prevenir la oxidación de la fluoresceína (1.5 ± 0.2 y 1.6 ± 0.3 Eq Tx), mientras que el efecto protector obtenido con los derivados dimetilamino fue más de 8 veces superior (8 ± 1 y 13 ± 2 Eq Tx) al estándar. La exposición a ABAP indujo un decaimiento significativo en sus bandas de absorción UV-Vis. Por último, se estudió la protección de la oxidación de la LDL utilizando el método de TBARS por HPLC. La lipoperoxidación fue desencadenada por ABAP 30 mM durante 30 minutos a 37 °C. Los valores de MDA en muestras con nitroalquenos presentaron una reducción del entorno del 50% respecto de muestras sin éstos, demostrando su capacidad de prevenir cadenas de lipoperoxidación. Estos resultados muestran a los nitroalquenos alifáticos aromáticos sintetizados como líderes promisorios para futuros desarrollos.

❖ Abreviaturas

ABAP	dicloruro de 2,2'-azo-bis (2-amidinopropano)
AE	Acetato de Etilo
AMVN	2,2'-azo-bis (2,4 dimetil) valeronitrilo
ApoB100	Apoproteína B100
ATP	Adenosin trifosfato
BHT	<i>tert</i> - butilhidroxitolueno
CAT	Catalasa
EP	Éter de Petróleo
ER	Especies reactivas
ERO	Especies reactivas del oxígeno
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
GPx	Glutación Peroxidasa
GR	Glutación Reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación disulfuro
HMBC	Experimento de correlación heteronuclear a distancia (siglas en inglés)
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance (sigla en inglés)
HSQC	Experimento de correlación heteronuclear a un enlace (sigla en inglés)
ICAM	Molécula de adhesión intercelular (sigla en inglés)
LDL	Lipoproteína de baja densidad (sigla en inglés)
MCP	Cofactor de membrana proteico (sigla en inglés)
MDA	Malondialdehído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NF-κB	Factor nuclear κB
NOS	Óxido nítrico sintasa
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity (acrónimo en inglés)
PUFA	Ácido graso poliinsaturado (sigla en inglés)

RMN	Resonancia magnética nuclear
ROO [•]	Radical peroxilo orgánico
SOD	Superóxido dismutasa
TA	Temperatura ambiente
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina (sigla en inglés)
TMTP	Tetrametoxipropano
VCAM-1	Molécula de adhesión al vaso 1 (sigla en inglés)
XO	Xantina oxidasa

❖ Índice

1. Introducción	
1.1. Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.....	8
1.2. Estrés oxidativo.....	11
1.2.1. Modificaciones en ácidos nucleicos y proteínas.....	12
1.2.2. Peroxidación lipídica.....	13
1.3. Enfermedades asociadas al estrés oxidativo.....	15
1.3.1. Artritis reumatoidea.....	15
1.3.2. Aterosclerosis.....	15
1.4. Defensas antioxidantes.....	17
1.4.1. Agentes enzimáticos	18
1.4.2. Agentes no enzimáticos.....	19
1.5. Terapia antioxidante.....	21
1.6. Nitrocompuestos aromáticos como antioxidantes.....	23
2. Objetivos.....	26
3. Resultados y discusión	
3.1. Química:	
3.1.1. Síntesis de nitroalquenos.....	27
3.1.2. Síntesis de nitroalcanos.....	32
3.2. Ensayos in vitro:	
3.2.1. Efecto de la exposición a radical peroxilo en la absorción UV- Vis.....	37
3.2.2. Medida de la capacidad antioxidante.....	38
3.2.3. Análisis estructura-actividad.....	42

3.2.4. Protección de la oxidación de LDL.....	44
4. Conclusiones	47
5. Materiales y métodos.....	48
6. Referencias.....	56

❖ 1. Introducción

1.1 Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

Si bien el oxígeno cumple un rol biológico de extrema relevancia como aceptor final de electrones en seres vivos pertenecientes a las más diversas especies, la vida aerobia los expone a una serie de especies reactivas derivadas de su reducción parcial, dentro de las cuales se encuentran tanto radicales libres como especies oxidantes no radicalares. Los radicales libres son especies que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital más externo. Considerando que las moléculas tienden a alcanzar su estado más estable, estos radicales reaccionan rápidamente mediante la captura de un electrón de otra molécula de su entorno con el fin de estabilizar su estructura electrónica, generando de esa manera una molécula oxidada. La reducción de oxígeno molecular (O_2) produce moléculas relativamente estables, siendo la generación de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) el punto crítico para la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO). Este anión, es capaz de dismutar espontáneamente o de forma enzimática a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es precursor del radical hidroxilo ($\cdot OH$). *In vivo*, el $O_2^{\cdot-}$ es producido tanto de forma espontánea como catalizada por enzimas. [1].

La producción no enzimática de $O_2^{\cdot-}$ ocurre cuando un electrón es directamente transferido al O_2 , tal como sucede a nivel de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. En condiciones normales el oxígeno molecular se reduce a agua, lo cual implica la transferencia de 4 electrones, y se genera un gradiente de protones que proporcionan la energía necesaria para la síntesis de ATP (fig. 1.1). Como la cadena de transporte electrónico no es totalmente efectiva, en forma basal se producen pérdidas constantes de electrones, principalmente a nivel de los complejos I y III [2, 3]. Estos electrones reducen al oxígeno molecular dando lugar a la formación de $O_2^{\cdot-}$ el cual puede dismutar espontánea o enzimáticamente a H_2O_2 . Si bien una producción controlada de estas especies posee efectos beneficiosos en cuanto a la señalización [4] un aumento desmedido es capaz de generar efectos deletéreos *in vivo*, a través por ejemplo de la generación de radical hidroxilo ($\cdot OH$) mediante la reacción de

Fenton (Ec. 1.1) , una especie con fuerte carácter oxidante. Este radical es capaz de reaccionar con prácticamente cualquier molécula biológica. Esta reacción requiere de un paso previo de reducción del hierro férrico, la cual puede llevarse a cabo en presencia de superóxido dando como resultado la reacción de Haber-Weiss (Ecs.1.1 y 1.2), una reacción muy improbable debido a la rápida dismutación del superóxido y a que incluso del punto de vista termodinámico es desfavorable [5].

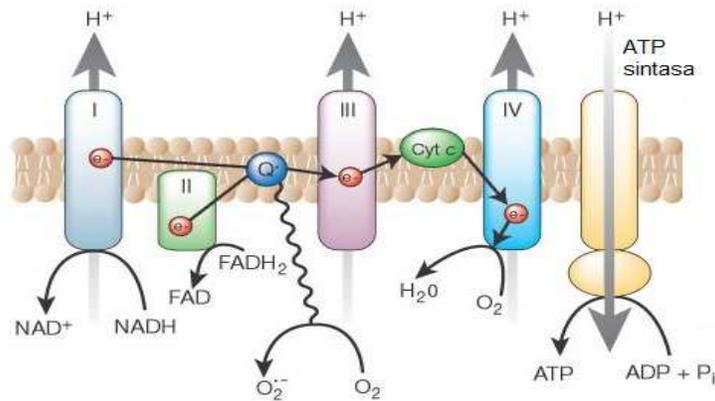


Figura 1.1: Fuga de electrones a nivel de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Adaptado de [6]

A su vez, la reducción de O_2 a $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede ser catalizada por diversas enzimas como la NADPH oxidasa (NOX), presente en membranas de células fagocíticas tales como polimorfonucleares, macrófagos y células endoteliales (Ec. 1.3).



Otra fuente enzimática de $\text{O}_2^{\cdot-}$, consiste en la conversión proteolítica de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa (XO), la cual genera $\text{O}_2^{\cdot-}$ así como su producto de dismutación, H_2O_2 [7] (Fig. 1.2).

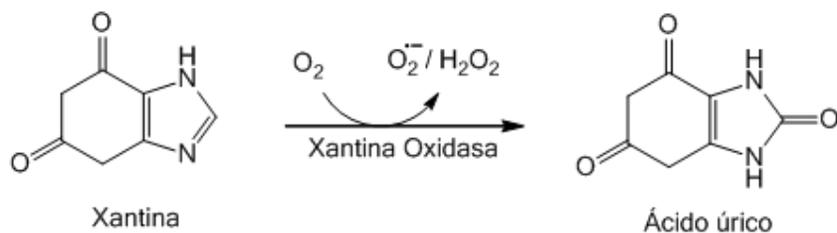
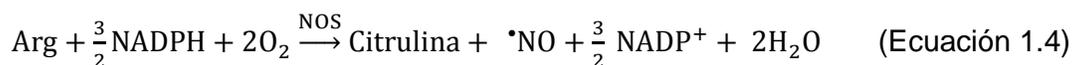


Figura 1.2: Formación de superóxido a expensas de la oxidación de xantina

Por otro lado, las especies reactivas del nitrógeno, derivan fundamentalmente del óxido nítrico ($\cdot NO$). El óxido nítrico es producido *in vivo*, por la oxidación aerobia de L-arginina catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS, Ec. 1.4). Su reacción con $O_2^{\cdot -}$ rinde peroxinitrito, un anión fuertemente reactivo y de vida media corta que al protonarse ($pK_a = 6,8$), el ácido peroxinitroso resultante se descompone homolíticamente a $\cdot OH$ y dióxido de nitrógeno ($\cdot NO_2$). Alternativamente, también puede reaccionar con ácidos de Lewis como el dióxido de carbono para dar radical carbonato y $\cdot NO_2$ [8, 9] .



Además de la producción endógena, este pool de especies reactivas puede surgir como reacción a diferentes factores exógenos, como ser la exposición a toxinas, fármacos, infecciones y radiación ionizante entre otras. En la figura 1.3 se resumen las principales vías de generación de especies reactivas.

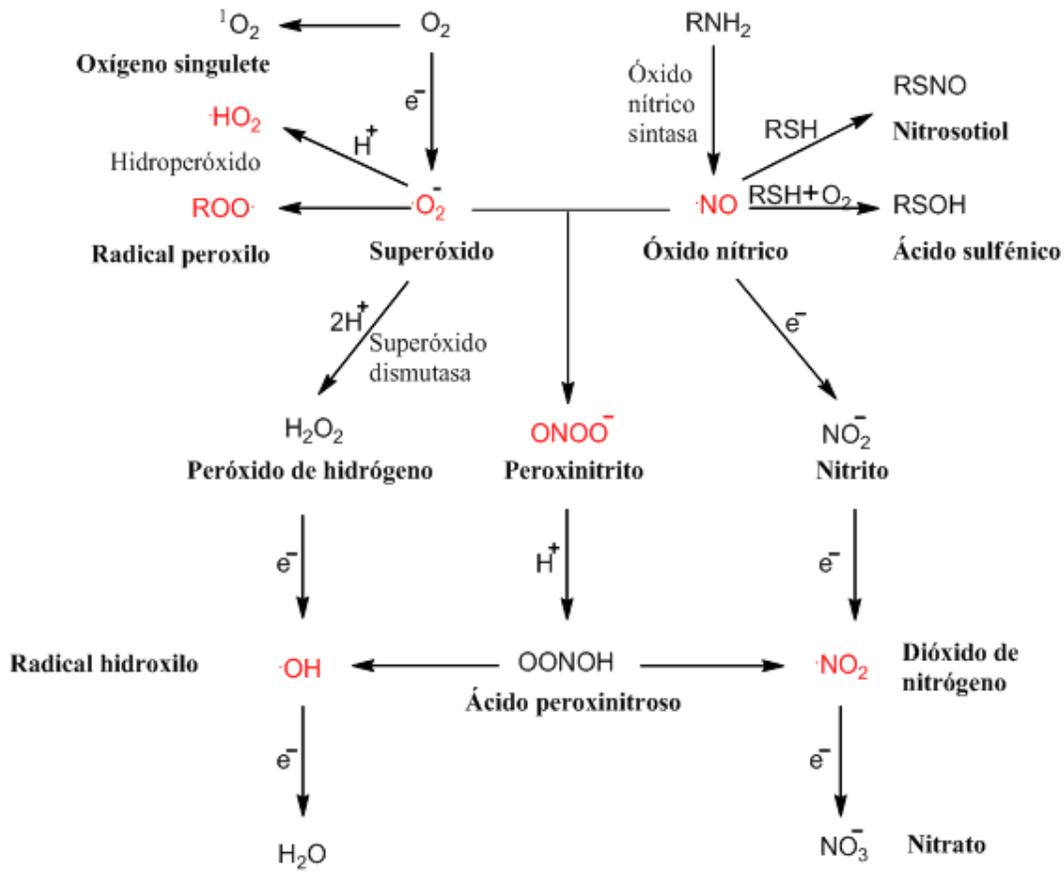


Figura 1.3: Principales vías de formación de especies reactivas a nivel celular. Adaptado de [10].

1.2 Estrés oxidativo

Si bien las especies reactivas han sido propuestas históricamente como tóxicas y dañinas de diversas estructuras subcelulares, varias de ellas también cumplen roles significativos a nivel biológico, como lo son la señalización celular, la defensa contra patógenos e incluso como antioxidantes endógenos. Como ejemplo de esto último, se encuentra el caso del radical $\cdot NO$. La actividad antioxidante del $\cdot NO$ está definida principalmente por su velocidad de síntesis. Dado que la difusión en lípidos es entre 6 y 10 veces más baja y la solubilidad es 3 veces más alta que en agua, el $\cdot NO$ reacciona con peróxidos lipídicos inhibiendo el daño oxidativo [11-13]. Por otra parte, este radical ha

sido descrito como un factor de relajación esencial derivado del endotelio, siendo capaz de activar la enzima guanilato ciclasa soluble [14, 15].

A su vez, en los procesos inflamatorios las especies reactivas cumplen un importante rol. La activación de células polimorfonucleares, endoteliales y macrófagos en un tejido en donde se desarrolla una respuesta inflamatoria, conlleva la generación de $O_2^{\cdot-}$, debido a la activación de NADPH oxidasas localizadas en las membranas de dichas células, así como a la liberación de mieloperoxidasa la cual utiliza H_2O_2 para la formación de hipoclorito ($HClO^{\cdot-}$) [16]. Asimismo, en macrófagos activados, se observa la inducción de la óxido nítrico sintasa 2 (iNOS), cuyo producto el $^{\cdot}NO$, al reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ forma $ONOO^{\cdot}$. Las especies generadas por estas enzimas, poseen un fuerte carácter oxidante y esto constituye la primer línea de defensa del hospedero frente a organismos agresores [17].

Dado que se trata de especies potencialmente nocivas para los sistemas biológicos, su producción se encuentra altamente regulada y existen diversas estrategias para mitigar sus efectos. Sin embargo, cuando se da un aumento exacerbado de las moléculas pro-oxidantes, ya sea por una producción excesiva como por una insuficiente neutralización, suele verse aumentada la susceptibilidad de moléculas tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos al daño oxidativo. Esta situación lleva a un estado que genera pérdida de señalización redox que es conocida como “estrés oxidativo” [18, 19].

1.2.1 Modificaciones en ácidos nucleicos y proteínas

A nivel del ADN, la exposición a ER produce modificaciones de todos sus componentes, principalmente por acción del radical $^{\cdot}OH$, siendo la 8-hidroxi-guanosina el marcador molecular más importante y estudiado. La permanencia de dichas mutaciones, puede asociarse a eventos tales como carcinogénesis o envejecimiento [20, 21]. Por otra parte, a nivel de las proteínas, aquellas ricas en residuos metionina y cisteína, los cuales presentan grupos tioéter y tiol, son especialmente susceptibles [22, 23]. La oxidación de cisteína puede dar lugar a la formación reversible de disulfuros mixtos entre tioles de proteínas y tioles de bajo peso molecular, en particular S-

glutathionilación por adición del tripéptido glutatión (GSH) a residuos de cisteína de la proteína. Las consecuencias del daño oxidativo en proteínas son muy diversas, tales como cambios conformacionales, formación de agregados proteicos, o la propia ruptura de enlaces peptídicos, lo que puede conllevar la ganancia o pérdida de funcionalidad. Un importante marcador molecular del daño oxidativo en proteínas detectable, es la 3-nitrotirosina [24-27]. Este aducto es formado a partir del ataque de $\cdot\text{NO}_2$, y es una de las modificaciones proteicas postraduccionales oxidativas más frecuentes que lleva al reconocimiento de la proteína modificada por el sistema inmune con consecuencias devastadoras [27-29].

1.2.2 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica o lipoperoxidación, es un proceso mediado por especies radicalares, que consiste en una serie de ataques nucleofílicos a los lípidos presentes en las células, que generan radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) a nivel de los ácidos grasos [30]. En particular los fosfolípidos presentes en las membranas biológicas presentan una alta susceptibilidad a la lipoperoxidación, ya que al estar compuestos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA por su sigla en inglés), estos representan importantes centros electrofílicos altamente sensibles a la oxidación. La oxidación de dichas estructuras por parte de especies radicalares, conlleva una serie de reacciones en cadena, las cuales concluyen en la formación de diversos productos carbonílicos [31] (fig. 1.4). Entre los marcadores moleculares más estudiados destacan el 4-hidroxinonenal, una molécula cuya citotoxicidad ha sido demostrada, capaz de causar modificaciones en proteínas, inducir apoptosis, y causar activación endotelial [32-34], y el malondialdehído, el cual ha sido reportado como un fuerte mutágeno intracelular, mediante la formación de aductos con la guanina [35-37].

La lipoperoxidación se inicia cuando un radical captura un átomo de hidrógeno de una cadena alifática. Cuando el ataque se da sobre un PUFA, se produce una estabilización por resonancia del radical lipídico, lo que resulta en la formación de un dieno conjugado, capaz de reaccionar con oxígeno para dar un peróxido lipídico. A su vez, este peróxido lipídico reacciona con otros lípidos

adyacentes, propagando el daño oxidativo. Los productos finales de descomposición son moléculas pequeñas entre las que destacan el malondialdehído y diferentes alquenaes [38].

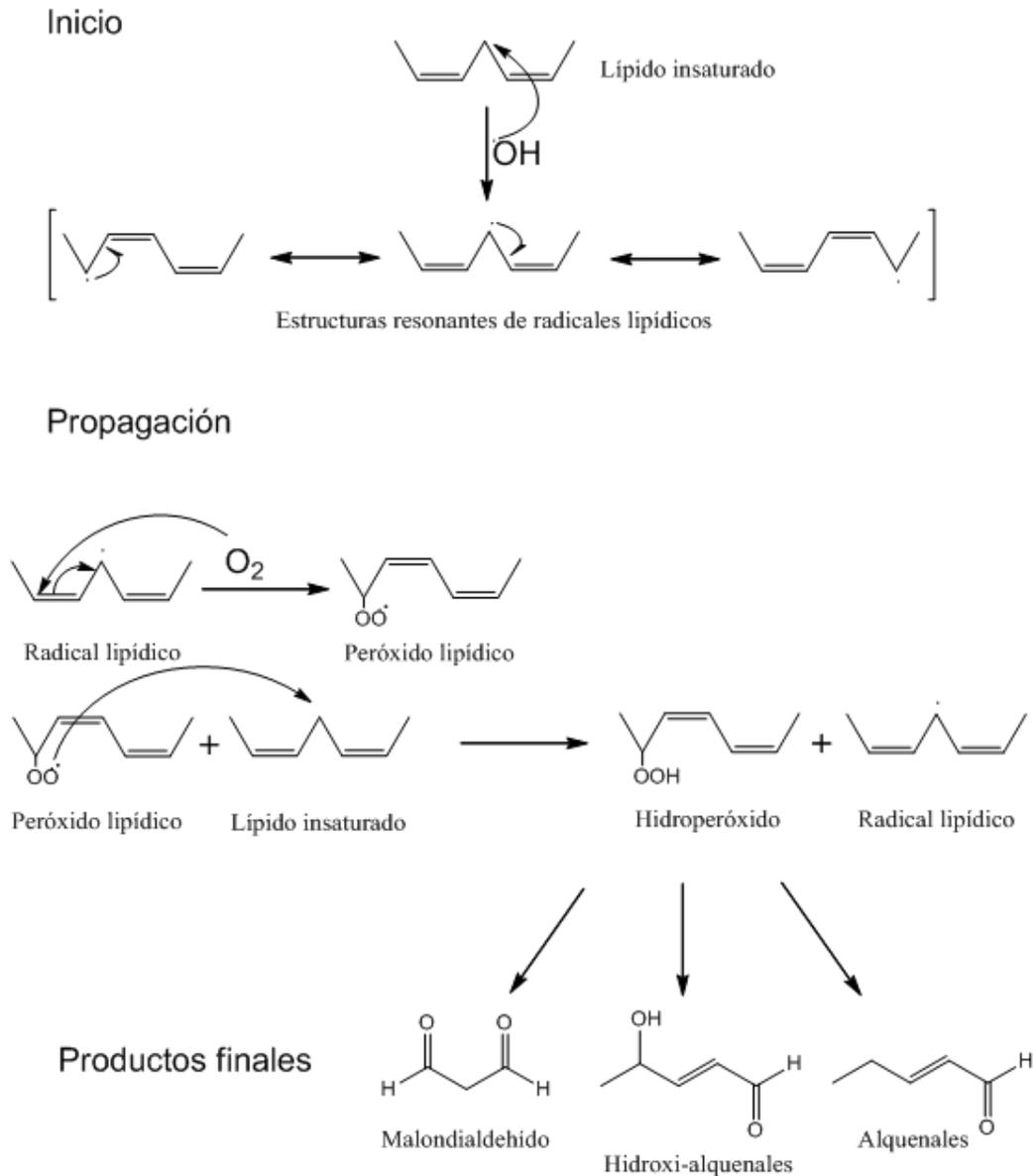


Figura 1.4: Formación y propagación de los peróxidos lipídicos. Una vez formados los radicales estos atacan a otros lípidos presentes en la célula generándose una serie de reacciones en cadena que resultan en la degradación de componentes, principalmente a nivel de las membranas. Adaptado de [39]

1.3 Enfermedades asociadas al estrés oxidativo

La vinculación entre las ER y la patología es muy compleja, dado que su presencia *in vivo* no está necesariamente relacionada con efectos negativos, tal como se explicitó previamente.

1.3.1 Artritis reumatoidea

La correlación positiva entre una excesiva producción de radicales libres y los desórdenes autoinmunes, ha sido demostrada. La capacidad inmunogénica de neoantígenos generados por pequeñas modificaciones en la estructura original de proteínas y lípidos ha sido involucrada en la etiología de diversas patologías, ya sea humanas como experimentales [40]. Particularmente en la artritis reumatoidea (AR), diversas modificaciones oxidativas y nitrativas a nivel del tejido sinovial han sido descritas. En la sinovial reumatoidea, se hallaron proteínas nitradas a nivel de los sinoviocitos, del endotelio vascular y del estroma peri vascular, y de algunos agregados linfocitarios [41]. Se ha observado la nitración de la región α -helicoidal del colágeno tipo II en el plasma de pacientes portadores de AR, así como la presencia de 3-nitrotirosina en muestras de cartílago de simios y humanos, asociadas al envejecimiento y al desarrollo de osteoartritis [42]. Las biomoléculas oxidadas así como nitradas pueden comportarse como neoantígenos e inducir una respuesta inmune. Ohmori y colaboradores demostraron que la inmunización con inmunoglobulinas autólogas nitradas induce la formación de anticuerpos (Ac) anti-nitrotirosina y de Ac anti-ADN de hebra simple [43].

1.3.2 Enfermedades cardiovasculares

Por otra parte, es conocida la relación entre la alta generación de especies reactivas y las enfermedades cardiovasculares, siendo una importante fuente de morbilidad y mortalidad [44].

La mayoría de los ataques cardíacos, y un importante número de casos de isquemia cerebral localizada, se producen como efectos secundarios de la aterosclerosis, una enfermedad que se caracteriza por el engrosamiento de la pared vascular, debido a la acumulación de células inflamatorias, en particular macrófagos cargados de colesterol y otros lípidos provenientes de la

internalización de LDL, conocidos como “células espumosas”, y también por miocitos provenientes de la media hiperplásica [45]. Los mediadores pro-inflamatorios que se generan por esta situación, ya sean moléculas quimiotácticas, citoquinas, o adipoquinas, aumentan el estado inflamatorio crónico, generando una excesiva producción de ERO [46]. En la fig. 1.5 se muestra el mecanismo de formación de la placa de ateroma.

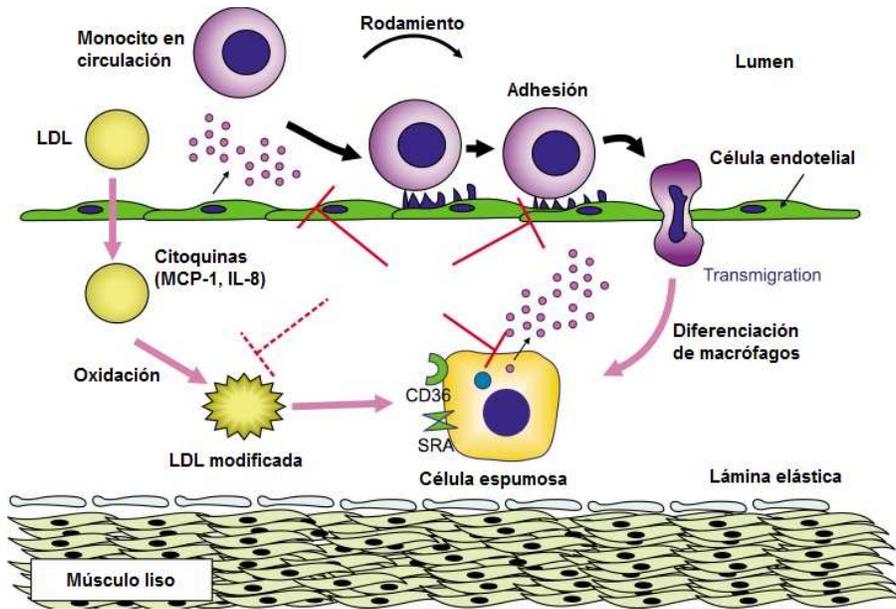


Figura 1.5: Mecanismo de formación de placas de ateroma. La proliferación de células espumosas, como resultado de la internalización de LDL oxidada se encuentra en la base de la aterosclerosis. Adaptado de [47].

Existe importante evidencia que vincula el estrés oxidativo y nitrosativo con la aterosclerosis, mediante diversos mecanismos como la formación de lipoproteínas aterogénicas [48]. La LDL es una proteína plasmática que posee un core hidrofóbico, rico en colesterol y ésteres de colesterol, una monocapa de fosfolípidos y una molécula de apolipoproteína B100 [49, 50]. Esta proteína es encargada del transporte de colesterol a los tejidos periféricos, y es captada por el hígado y por aquellos tejidos que contienen el receptor de ApoB100. Dado que este receptor es saturable, en condiciones de exceso de LDL, éste se satura, y el exceso puede ser internalizado por macrófagos a través de su unión al receptor “scavenger”, iniciando el proceso de aterosclerosis [51].

La aterosclerosis es causada por los lípidos depositados en la capa subendotelial de la pared arterial, los cuales son modificados formando LDL oxidada, dañando las células de la pared endotelial. Los daños generados en el endotelio desencadenan una respuesta inflamatoria, induciendo la aparición de moléculas de adhesión como las P y E selectinas, moléculas de adhesión vascular (VCAM-1), moléculas de adhesión intercelular (ICAM), y moléculas quimiotácticas que atraen monocitos (MCP), y factores de colonización macrofágica [52-54]. Luego de activar células por esta vía, los monocitos se diferencian a macrófagos, y se introducen en la pared por diapédesis. Los macrófagos cargados de lípidos (células espumosas) promueven la propagación de la placa de ateroma. Las citoquinas pro-inflamatorias que generan las células espumosas, desencadenan una respuesta inflamatoria local, lo que genera mayor cantidad de especies reactivas. De esta manera, se da la migración de células musculares a la íntima. Posteriormente, se liberan metalopeptidasas que degradan a las proteínas de la matriz extracelular. La pérdida de la matriz extracelular, lleva a la formación de cuerpos necróticos y a la ruptura de placas, con la consecuente liberación de trombos que pueden generar eventos cardiovasculares agudos, tales como infartos, o accidentes isquémicos más o menos transitorios que pueden afectar diferentes órganos, en particular corazón y cerebro [55, 56].

1.4 Defensas antioxidantes

Dado que la exposición a especies oxidantes puede alterar la biología molecular de la célula, el organismo trata de balancear la producción de radicales con un adecuado nivel de antioxidantes a nivel endógeno. Se define como antioxidante aquella molécula capaz de ceder electrones para evitar la oxidación de un sustrato oxidable, para lo cual poseen mecanismos de acción muy variados. Pueden actuar previniendo la formación de ER o interrumpiendo su ataque, secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en especies de menor reactividad, amplificando la resistencia de los blancos moleculares sensibles, facilitando la reparación de los daños generados o manteniendo un ambiente favorable para que actúen otros antioxidantes [57].

Desde un punto de vista funcional, se los puede clasificar como agentes antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

1.4.1 Antioxidantes enzimáticos

La formación de $O_2^{\cdot-}$, es contrarrestada por las diferentes isoformas de la superóxido dismutasa (SOD), una familia de metaloenzimas capaces de reducir el $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . Existen tres isoformas de la SOD: La Mn-SOD que es inducible por citoquinas a través de la vía del NF- κ B ; la Cu-Zn SOD cuya síntesis es constitutiva; y la SOD 3 la cual es secretada en el espacio extracelular [58-61]

La glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la reducción de H_2O_2 a H_2O , así como de hidroperóxidos a alcoholes acopladas a la oxidación de glutatión (GSH) a glutatión disulfuro (GSSG, Eq. 1.5 y 1.6) [62]. El GSSG resultante es regenerado mediante la enzima glutatión reductasa (GR) en presencia de NADPH (Eq. 1.7). Esta es la primera barrera de protección de la célula del H_2O_2 y es regulada por hipoxia y por la p53 [63-65].



Por otra parte, la catalasa (CAT) que también reduce el H_2O_2 a H_2O , presenta además una actividad peroxidasa que cataliza la oxidación de dadores de alcoholes y fenoles en presencia de lipoperóxidos. Su ubicación es fundamentalmente a nivel de los peroxisomas y lisosomas, organelos vinculados a la detoxificación y digestión celular [66].

Las peroxirredoxinas catalizan la reducción de H_2O_2 , de $ONOO^-$ y de peróxidos orgánicos en presencia de tiorredoxina, a expensas de NADPH [67, 68]. Durante la catálisis participa un residuo de cisteína (Cys) o cisteína peroxidática ubicado en el sitio activo del extremo amino terminal junto a residuos arginina, prolina y treonina. El anión tiolato ataca el peróxido, para

generar agua y ácido sulfénico en el sitio activo. Cuando la cisteína reactiva ataca al sulfénico (resolución), se forma un enlace disulfuro intercatenario. Por último el enlace disulfuro es regenerado a tiol [69]. Una enzima análoga dependiente de triparedoxina ha sido descrita en tripanosomátides, con importante habilidad para detoxificar peroxinitrito [70].

1.4.2 Agentes no enzimáticos

El glutatión (GSH) es un tripéptido formado por glicina, cisteína y glutamato, y es el tiol no proteico más abundante a nivel celular (Fig. 1.6). El GSH actúa como un agente reductor y es el antioxidante mayoritario entre las células que mantiene un fuerte control del estado redox. Es una molécula ubicua que es producida intracelularmente en concentraciones en el orden de mM, mientras que a nivel plasmático esos niveles disminuyen debido a su rápido catabolismo. Su distribución es en un 85–90% de forma libre en el citosol, pero también se encuentra compartimentalizada en organelos tales como mitocondrias, peroxisomas, matriz nuclear, y retículo endoplásmico luego de su síntesis citosólica. También está involucrado en varias funciones fisiológicas como señalización celular, metabolismo de xenobióticos, intercambio tiol-disulfuro, y es un importante reservorio de cisteína [71]. Puede actuar de forma directa sin enzimas, o en presencia de glutatión peroxidasa, y se regenera a glutatión reducido a expensas de NADPH (Ecs 1.5-1.7).

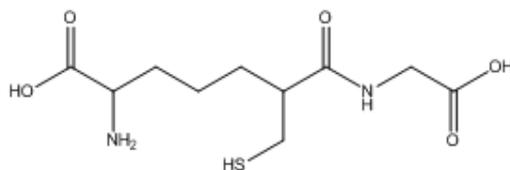


Figura 1.6: Estructura del glutatión reducido (GSH)

A pesar de la presencia de estos agentes endógenos, las defensas antioxidantes se complementan de un cierto número de especies que sólo se pueden obtener a través de la dieta. Existe una correlación positiva entre una buena nutrición y el buen funcionamiento de los mecanismos de defensa antioxidante [72, 73]. Estas moléculas comprenden el grupo de las vitaminas

como es el caso del ácido ascórbico o vitamina C, principal antioxidante extracelular hidrosoluble y esencial en diversas rutas metabólicas [74], que se adquiere fundamentalmente a partir del consumo de cítricos [75].

Por otra parte, la vitamina E (α -tocoferol) es el antioxidante lipofílico mayoritario, y su ingesta proviene principalmente de aceites y granos. Una deficiencia prolongada de α -tocoferol, por ejemplo debido a síndromes de mala absorción de grasas, es frecuentemente asociada a daños neurológicos severos. La acción antioxidante de α -tocoferol por otra parte, se propone que ayudaría a proteger de la oxidación a las lipoproteínas plasmáticas, evitando de esa forma la aterosclerosis. Sin embargo, la suplementación con esta vitamina no ha demostrado resultados favorables en ensayos clínicos al día de hoy [76, 77].

Por otra parte, la vitamina A es la otra vitamina liposoluble de relevancia y está asociada a las etapas de desarrollo de las células epiteliales, el crecimiento y desarrollo óseo, y la protección de la piel y de las mucosas [78-80].

Además de las vitaminas existe una serie de compuestos fenólicos provenientes principalmente de las frutas y verduras, entre los que destacan cumarinas, carotenoides, flavonoides y polifenoles con propiedades antioxidantes.

Diversos estudios poblacionales establecen que la dieta mediterránea es la que proporciona mejores niveles de agentes antioxidantes, lo cual se traduce en menores niveles de daño oxidativo. Marin y colaboradores demostraron la correlación positiva entre el consumo de una dieta de este tipo y la baja inducción de ERO, resultando en una reducción de la apoptosis y del porcentaje de acortamiento de telómeros [81].

Algunos mecanismos se encuentran ampliamente descritos, como es el caso de la sinergia entre las vitaminas C y E. El α -tocoferol evita la oxidación de lípidos en la membrana, mediante la formación de un radical de mayor estabilidad y menos liposoluble. Este radical se acerca a la superficie, donde el

ascorbato lo regenera para de esa forma iniciar un nuevo ciclo antioxidante (fig. 1.7).

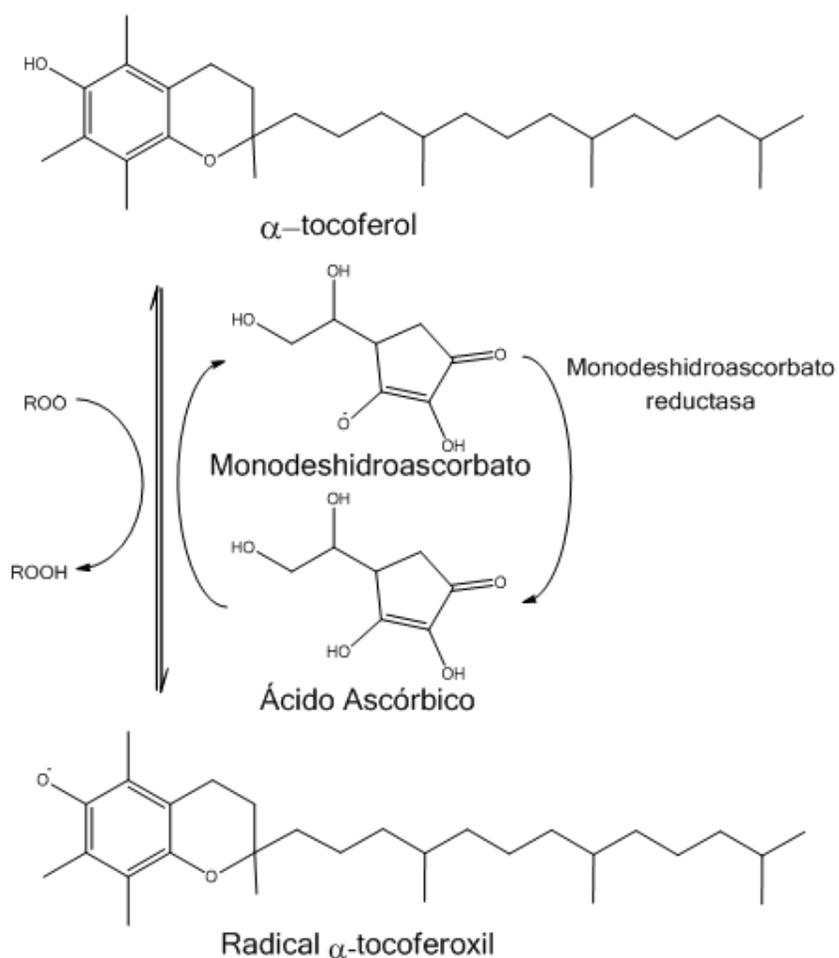


Figura 1.7: Efecto sinérgico observado in vivo entre las vitaminas C y E. el α -tocoferol forma un radical estable a nivel de la membrana; una vez que sale a superficie es regenerado por el ascorbato que se encuentra en la superficie.

1.5 Terapia antioxidante

El hecho de que los agentes antioxidantes puedan actuar de forma sinérgica in vivo, es una propiedad interesante que ha sido empleada en la síntesis de agentes antioxidantes híbridos. La forma soluble de la vitamina E (Trolox) y tert-butilhidroxitolueno (BHT) son ejemplos de agentes antioxidantes sintéticos de uso común en el laboratorio [82].

No se poseen descripciones concluyentes acerca de los beneficios del uso de agentes antioxidantes sintéticos como quimioprevención en humanos. Existen grandes inconvenientes para la implementación de agentes antioxidantes sintéticos, derivados de la falta de diferencias estadísticamente significativas entre los valores normales y los post-tratamiento, y de una fuerte controversia de resultados obtenidos por diferentes autores acerca de los beneficios a largo plazo del uso de suplementos antioxidantes [76, 83]. Aunque estos estudios poblacionales no apoyan el uso de antioxidantes como terapia, estos resultados pueden deberse a una inhibición no selectiva de especies reactivas. Como se explicitó previamente, algunas especies oxidantes como el óxido nítrico e incluso el peróxido de hidrogeno presentan importante relevancia a nivel de la señalización subcelular. Debido a esto, es que se hace importante la búsqueda de nuevos fármacos capaces de inhibir selectivamente a las especies más nocivas en orden de obtener mejores resultados [11, 84, 85].

Un ejemplo de antioxidante sintético que ha demostrado buenos resultados *in vivo* es el fármaco probucol, el cual tiene propiedades antioxidantes *in vitro* y ha sido descrito como capaz de generar baja progresión de aterosclerosis en animales y en algunos estudios realizados en el hombre [86-90]. De igual manera que sucede con el α -tocoferol, el radical fenoxilo del probucol podría ser reciclado nuevamente a probucol en la LDL por el ascorbato. En la figura 1.8 se muestran este y otros ejemplos de agentes antioxidantes sintéticos utilizados en terapia.

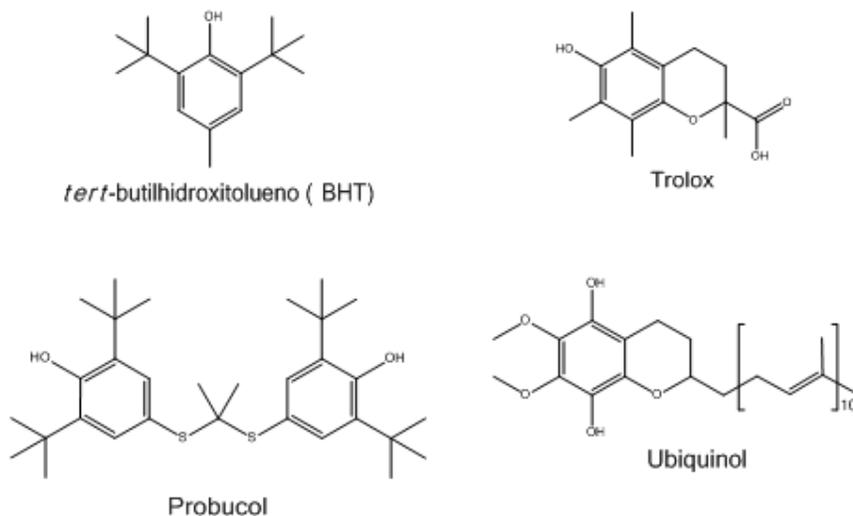


Figura 1.8: Ejemplos de agentes antioxidantes sintéticos empleados en el laboratorio y en ensayos clínicos

1.6 Nitroalquenos como agentes antioxidantes

Los nitroalquenos aromáticos son reactivos importantes en química orgánica, debido a que son fácilmente accesibles vía reacción de Henry, y que mediante rearrreglo de Nef son capaces de liberar óxido nítrico (fig. 1.9).

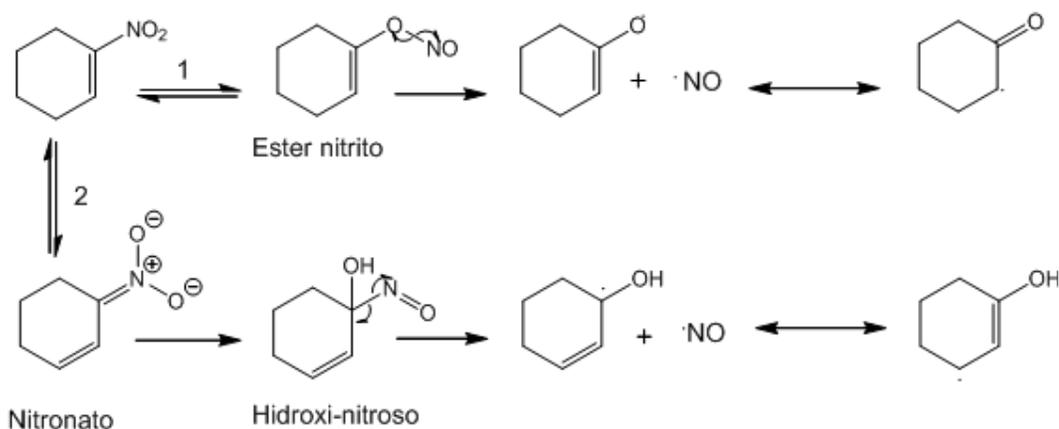


Figura 1.9: Mecanismos propuestos de liberación de óxido nítrico por parte de nitroalquenos, adaptado de [91] 1. Reacción de Nef modificada 2. Rearreglo

Esta última propiedad los vuelve especialmente interesantes en farmacología, ya que una liberación controlada de óxido nítrico puede tener efectos positivos en el organismo, dado que como se detalló previamente el mismo es un factor

de relajación esencial del endotelio [92]. Desde que se descubrieron los efectos positivos de este gas sobre el sistema circulatorio, diversos fármacos han sido desarrollados para inducir su liberación. Los mecanismos de acción incluyen tanto la liberación directa, como la inducción de la enzima blanco de su acción, la guanilato ciclasa soluble [93-95].

Se ha demostrado que nitroderivados de ácidos grasos insaturados conteniendo un grupo nitroalqueno, son capaces de modular vías señalización tanto metabólicas como inflamatorias [96]. El nitro-linoleato ha sido descrito como inhibidor de la generación de superóxido, la degranulación y la expresión de integrinas por neutrófilos [97], mientras el ácido nitro-oleico ha sido descrito como un ligando endógeno del receptor hormonal nuclear PPAR γ [98]. Aunque estos compuestos son capaces de liberar de \cdot NO [99], su liberación es relativamente pobre en soluciones acuosas [100]. Sin embargo, tanto el ácido nitroaraquidónico como su derivado metiléster fueron capaces de liberar \cdot NO en presencia de células endoteliales, promoviendo la generación de GMPc [101]. El ácido nitro-araquidónico disminuyó la expresión de la NOS2 y la secreción de citoquinas proinflamatorias por macrófagos activados y esta actividad fue independiente de la liberación de \cdot NO [102]. Además, diferentes derivados nitrados fueron capaces de inducir la expresión de la hemoxigenasa 1 tanto en células endoteliales como en macrófagos, mediante mecanismos tanto dependientes como independientes de la liberación de \cdot NO [103-105]. El nitrolinoleato por su parte inhibió la proliferación del músculo liso vascular mediada por Nrf2 [106], interfiriendo además con la migración nuclear de NF κ B [107]. A nivel cardio-vascular, derivados nitrados de ácidos grasos insaturados fueron capaces de inhibir el aumento de presión arterial inducido por angiotensina II [108], y cuando se administraron a un modelo murino de isquemia/reperfusión redujeron el tamaño del infarto y mejoraron la funcionalidad ventricular [107]. El potencial terapéutico de estos compuestos con importantes propiedades antioxidantes y moduladoras de la respuesta inmune es un motivo de estudio actual [96] con potencialidades importantes.

En nuestro grupo se han desarrollado previamente una serie de nitroalquenos aromáticos para-sustituidos los cuales presentaron buena capacidad

antioxidante *in vitro*, relacionada con el grupo R sustituyente en la posición *para*. Cabe destacar que dichos compuestos fueron testados en modelos animales demostrando propiedades antiinflamatorias e incluso analgésicas [109]. Por otra parte, los derivados nitroalcanos de las moléculas previamente mencionadas fueron sintetizados y testados, observándose una capacidad antioxidante aún mayor [110]. Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo nos propusimos realizar la síntesis y caracterización de nitroalquenos y sus derivados nitroalcanos, como potenciales agentes antioxidantes *in vitro*.

❖ **Objetivo general**

Obtener nitroalquenos y nitroalcanos aromáticos *para*-sustituidos, para su posterior evaluación como agentes antioxidantes.

❖ **Objetivos específicos**

1. Poner a punto diferentes técnicas de síntesis para la obtención de nitroderivados, así como la estandarización de otras descritas en estudios anteriores del grupo.
2. Sintetizar y caracterizar fisicoquímicamente los nitroalquenos y nitroalcanos que se estandarizó su síntesis.
3. Estudiar la capacidad antioxidante de las moléculas sintetizadas.
4. Testear los productos obtenidos en cuanto a su capacidad antioxidante, y estudiar su potencial como posibles agentes quimiopreventivos de la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL).

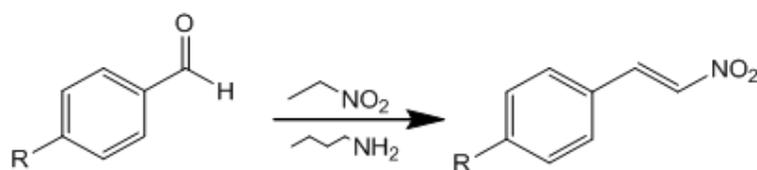
❖ Resultados y Discusión

3.1 QUÍMICA

3.1.1 Síntesis de nitroalquenos

La primera parte de este trabajo se centró en la síntesis de una serie de nitroalquenos aromáticos de gran diversidad estructural, los cuales consistieron en un núcleo aromático, una función nitroalqueno en la posición 1, y diversos grupos sustituyentes en la posición 4 con variadas propiedades estereoelectrónicas. Para el desarrollo de esta etapa, fue necesario la puesta a punto de las técnicas a utilizar tanto para la obtención de los productos diseñados como su purificación.

Según descripciones previas de nuestro grupo, la reacción se desarrolla óptimamente a través de una reacción de Henry (condensación nitroaldólica) (esq. 3.1) [110]. Esta reacción consiste en el ataque nucleofílico al carbonilo de un aldehído por parte del ion nitronato de un nitroalcano de cadena corta. La adición del nitroalcano genera un intermedio nitroaldol, y la subsecuente eliminación de agua resulta en la formación del nitroalqueno (fig. 3.1).



Esquema 3.1.
Reacción de Henry para la obtención de nitroalquenos a partir del correspondiente aldehído y nitroetano.

La condensación nitroaldólica presenta mayores rendimientos en presencia de una amina catalizadora, que favorece la selectividad de la adición. Esta amina, en nuestro caso *n*-butilamina, es capaz de abstraer el protón adyacente al grupo nitro, y de esa manera genera el ion nitronato que desencadena la reacción.

El rendimiento descrito en la literatura para esta reacción se sitúa entre 65-95% [111].

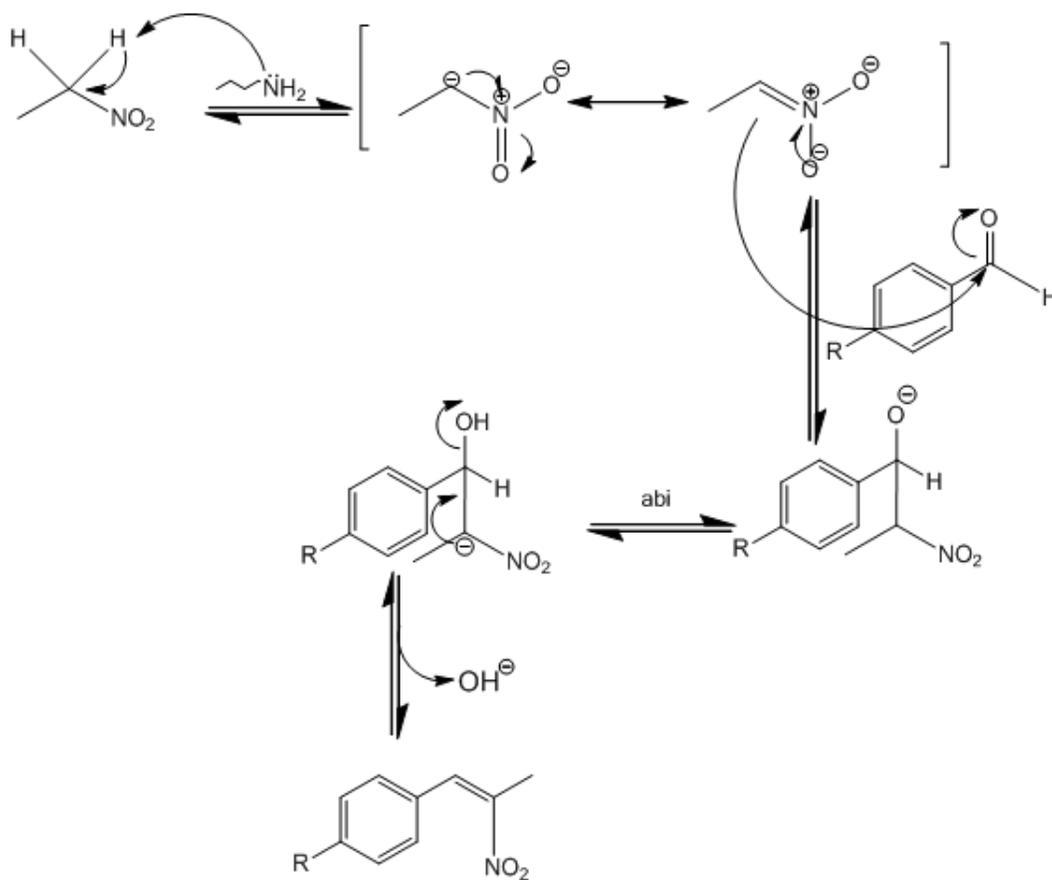
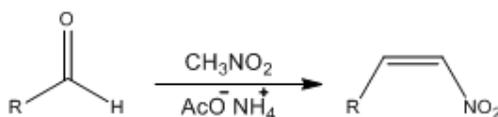


Figura 3.1: Mecanismo de condensación nitroaldólica. En una primera etapa se forma el ión nitronato que ataca al carbonilo del aldehído y se forma así el intermedio de reacción, nitroaldol. Una vez que se da la formación del alcohol por medio de una reacción ácido-base interna, el mismo es eliminado para la formación del doble enlace α - β insaturado.

Para los efectos de este trabajo, se utilizó como disolvente tanto etanol como nitrometano. La utilización de etanol como disolvente ya se encontraba estandarizada en trabajos previos del grupo. Sin embargo, la utilización de nitrometano como reactivo-disolvente así como la sustitución de la base *n*-butilamina por acetato de amonio, tal como describen Mock y colaboradores [112], rindió una notoria mejora en los rendimientos de varias reacciones (tabla 3.1). Este es el caso de los derivados (*Z*)-4-(1-etenil-2-nitrofenil)-acetamida y (*Z*)-(1-etenil-2-nitro)-4-metiltiobenceno.



Esquema 3.2: Esquema de reacción con nitrometano como reactivo- disolvente

Tabla 3.1 Comparación de reactividad con diferentes condiciones

Reactivo	Condiciones	Resultados	Condiciones	Resultados
<i>p</i> -metiltio-benzaldehído	<i>n</i> -butilamina/ EtOH	Subproductos	AcONH ₄ / CH ₃ NO ₂	Obtención de nitroalqueno sin subproductos
<i>p</i> -acetamido-benzaldehído	<i>n</i> -butilamina/ EtOH	No reacciona	AcONH ₄ / CH ₃ NO ₂	Obtención de nitroalqueno Sin subproductos
<i>piridin</i> -carboxialdehído	<i>n</i> -butilamina/ EtOH	Subproductos	AcONH ₄ / CH ₃ NO ₂	Subproductos

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en condiciones de reflujo, controladas a una temperatura no mayor a los 80 °C y su avance se siguió mediante TLC (EP/AE 8:2) (fig. 3.2). Los productos se purificaron por recristalización con etanol y por cromatografía en columna (EP/AE 8:2).

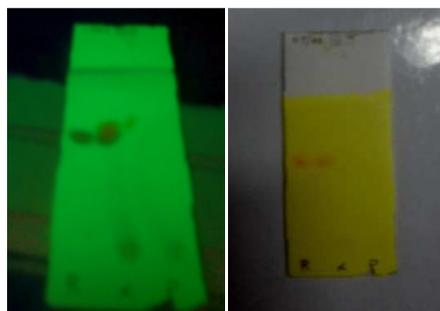
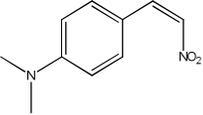
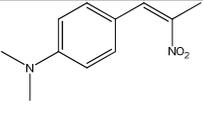
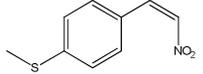
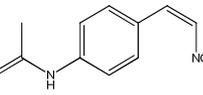
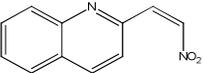


Figura 3.2.: Patrón de TLC característico para la aparición del nitroalqueno revelado con luz UV (254 nm) derecha y con Brady izquierda. La ausencia de señales en el revelado con Brady (izquierda) denota la desaparición del grupo aldehído y de esa manera el fin de la reacción.

Los derivados sintetizados, así como sus rendimientos y tiempos de reacción optimizados se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2: Nitrolaquenos obtenidos, con sus rendimientos y tiempos de reacción

Estructura	Nombre	Rendimiento (%)	Tiempo de reacción (h)
	<i>(Z)</i> - <i>N,N'</i> -dimetilamino-4-(1-etenil-2-nitro)-benceno (1)	30	2
	<i>(Z)</i> - <i>N,N</i> -dimetilamino-4-(2-nitroprop-1-enil)-benceno (2)	71	18
	<i>(Z)</i> -(1-etenil-2-nitro)-4-metiltiobenceno (3)	61	3
	<i>(Z)</i> -4-(1-etenil-2-nitrofenil)-acetamida (4)	78	1
	<i>(Z)</i> -2-(1-etenil-2-nitro)-quinolina (5)	15	2

Además de los cinco nitrolaquenos sintetizados que se muestran en la tabla 3.2, se intentó la síntesis del nitroetenilpiridino derivado en las condiciones antes mencionadas. Se obtuvo una mezcla de reacción que no pudo ser separada en ninguna de las condiciones cromatográficas ensayadas, por lo que se desestimó su preparación.

Todos los compuestos mostrados en la tabla 3.2 fueron caracterizados mediante resonancia magnética nuclear de protón y carbono trece (HMBC, HSQC). A continuación, se detalla el espectro RMN de protón obtenido para el compuesto **3**, *(Z)*-(1-etenil-2-nitro)-4-metiltiobenceno (fig. 3.3).

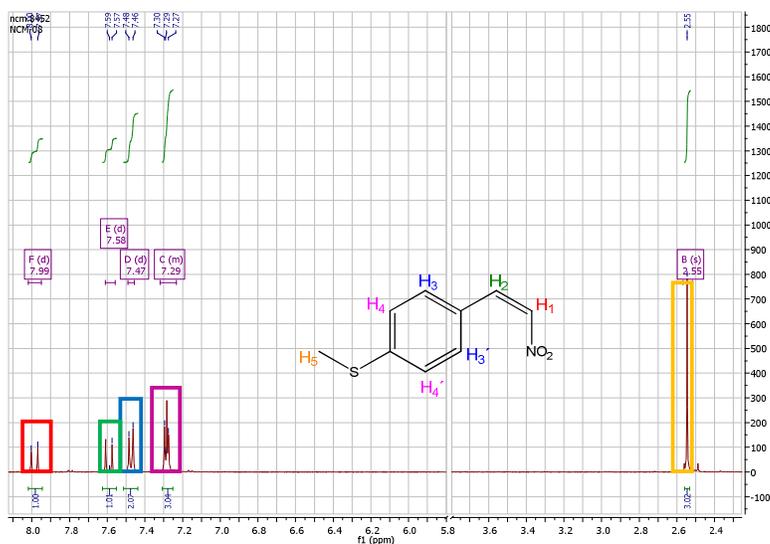


Figura 3.3.:
Espectro ¹H RMN de 1-(2-nitroeteni)-4-metiltiobenceno (**3**) en CDCl₃ obtenido a 23 °C, a 400 MHz con Si(CH₃)₄ como estándar interno.
Inserto: Estructura del nitroalqueno **3**.

Las señales del espectro de ¹H RMN se ven afectadas por la presencia de heteroátomos, por lo que los desplazamientos químicos de protones adyacentes a éstos presentaron diferencias en virtud de cada sustituyente. Las señales correspondientes a los protones aromáticos, se pueden visualizar como dobletes desplazados a campo bajo a ~7.2 y ~7.5 ppm, debido a la alta electrofilicidad que le confiere el anillo. Asimismo, los protones olefínicos se pueden evidenciar en forma de dobletes desplazados a campo bajo, ya que se encuentran adyacentes al nitrógeno, que posee un fuerte carácter electrón-atrayente. Por lo tanto, su presencia se puede evidenciar entre 7.6 y 8.0 ppm. Estas señales se correlacionan con la presencia de protones del grupo metino, según datos de tablas [113]. Por otra parte la aparición de estos grupos de señales, es a su vez coherente con la ausencia de señales en el entorno de las 10 ppm, las cuales son características del grupo carbonilo del aldehído de partida. Con el objetivo de estudiar la distribución de los carbonos, se analizaron los espectros de correlación heteronuclear bidimensional ¹H – ¹³C, HMBC y HSQC respectivamente. En un experimento HSQC, se observan solamente los desplazamientos químicos de los protones unidos a carbono, mientras que en el HMBC se observa el acoplamiento entre cada protón y los carbonos situados a dos o tres enlaces del protón en cuestión. En la figura 3.4, se muestran los espectros de correlación obtenidos para el nitroalqueno **3**. La presencia de 2 señales en el espectro de HMBC a 7.48 ppm (correspondiente a protones aromáticos) demuestra que el protón en cuestión se encuentra

acoplado a las señales de dos carbonos, por lo que dicha señal pertenece al protón H₄.

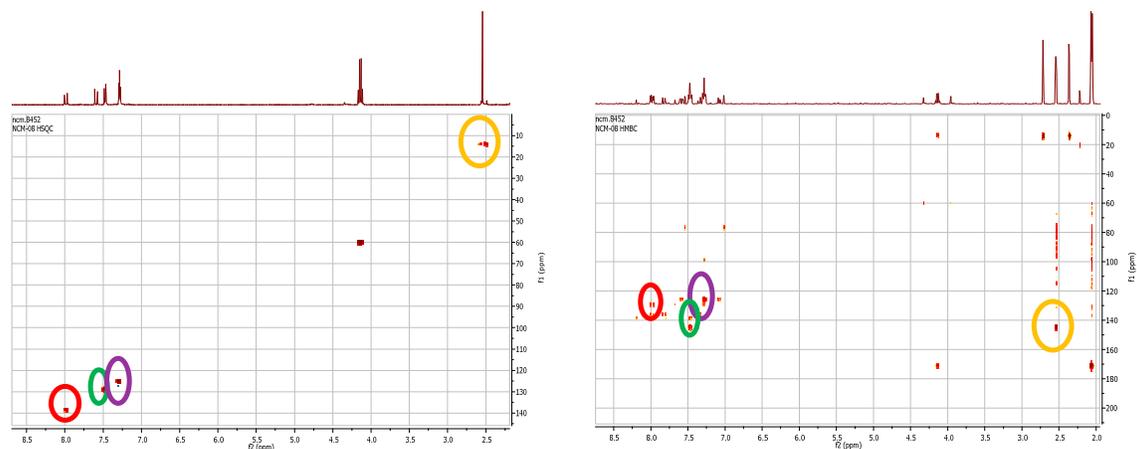


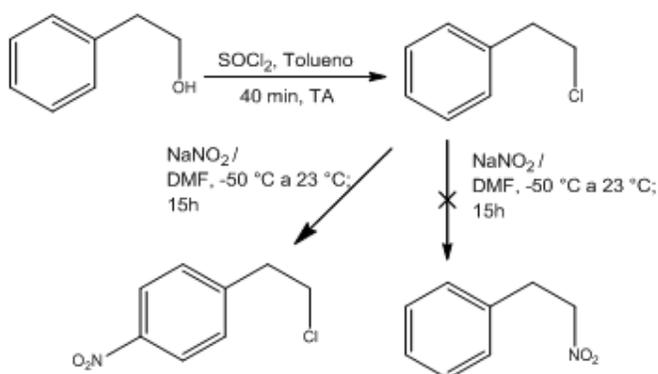
Figura 3.4: Espectros obtenidos para el compuesto **3** a 23°C en CDCl₃ a 400 MHz y 100MHz, con Si(CH₃)₄ como estándar interno. **a)** Espectro HSQC, **Inserto:** Estructura del compuesto **3** **b)** Espectro HMBC

Los valores de constantes de acoplamiento obtenidos ($J=12$ Hz) a partir de los espectros de ¹H RMN de cada compuesto para los protones olefínicos, sugieren que los productos aislados presentan una isomería geométrica de tipo Z para todos los casos.

3.1.2 Síntesis de nitroalcanos:

Para el abordaje inicial de la síntesis de nitroalcanos, se planteó una ruta sintética mediante sustitución nucleofílica a partir de alcoholes adecuadamente sustituidos. El primer paso de esta ruta sintética, la halogenación del grupo hidroxilo se desarrolló con buenos rendimientos a temperatura ambiente. El segundo paso de la reacción consiste en a sustitución nucleofílica del cloruro por nitrito de sodio, según las condiciones que se muestran en el esquema 3.3, de acuerdo a lo descrito en la literatura. En estas condiciones nunca fue posible obtener el producto de interés sino que se consiguió el producto nitrado a nivel del anillo aromático que se muestra en dicho esquema. La baja reproducibilidad de las condiciones de reacción descritas en la literatura, puede ser una explicación posible de la no obtención del producto de interés. Dado que no fue posible la obtención de los nitroalcanos por sustitución de los cloruros

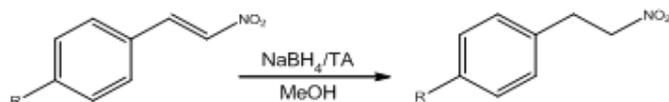
correspondientes con nitrito de sodio se procedió a la obtención a partir de la reducción del doble enlace del nitroalqueno.



Esquema 3.3: Ruta sintética para la obtención de nitroalcanos por sustitución del grupo alcohol. La cloración en la posición 1 favorece la posterior sustitución nucleofílica. La reacción no rindió los productos deseados.

Para la síntesis de los nitroalcanos se utilizó un agente reductor suave (borohidruro de sodio), dado que el mismo reacciona selectivamente, según el mecanismo descrito en [111], sin la obtención de productos secundarios y con buenos rendimientos. En dicho proceso, se utiliza un mol del correspondiente nitroalqueno por cada 2 moles del agente reductor. Una mejora de la técnica descrita viene dada por la inclusión de metanol como disolvente, ya que se favorece la metoxilación del borohidruro. La formación de este intermedio favorece la selectividad de la reducción, evitándose así la reducción del grupo nitro (fig. 3.5).

a)



b)

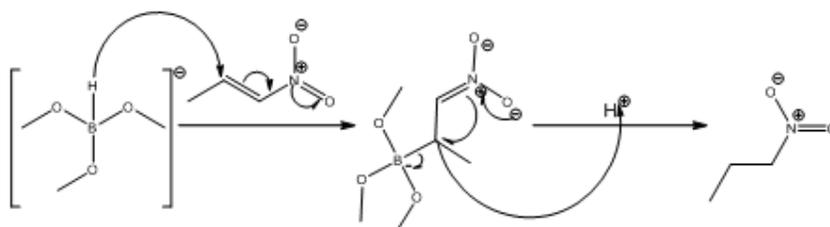


Figura 3.5: a) Reducción de nitroalquenos con NaBH_4 b) Mecanismo de reacción, mostrando que la formación de metoxi-borohidruro favorece la selectividad de la reducción

Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y se controló el avance de las mismas mediante TLC (EP/AE 9:1). A su vez, fue necesaria la implementación de una atmósfera de nitrógeno, ya que el borohidruro de sodio es capaz de reaccionar débilmente con el agua del ambiente lo cual puede llevar a leves pérdidas de rendimiento.

Dado que la polaridad de los nitroalquenos como de los nitroalcanos es muy similar se observa como una señal doble en las co-siembras de reactivos y productos en las TLC (fig. 3.6), visibles tanto por exposición a la luz UV como por tinción con vapores de yodo. Estas señales dobles reflejan la presencia de una segunda especie de menor polaridad que se corresponde con el nitroalcano, lo cual es consistente con la aparición del producto de interés.

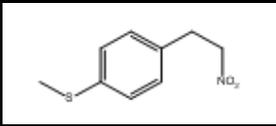
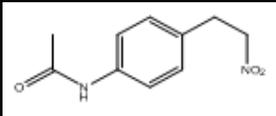


Figura 3.6: TLC característico de la obtención de nitroalcano. Carril izquierdo nitroalqueno, carril central co-siembra de nitroalqueno y mezcla de reacción y carril derecho nitroalcano

En la tabla 3.3, se muestran los nitroalcanos obtenidos así como el rendimiento de obtención de los mismos y tiempos de reacción.

Tabla 3.3: Nitroalcanos obtenidos, sus rendimientos y tiempos de reacción

Estructura	Nombre	Rendimiento (%)	Tiempo de reacción (min)
	1- dimetilamino- 4-(2-nitroetil) benceno (6)	61	40
	1-dimetilamino-4-(2-nitropropil)benceno(7)	86	40

	1-metiltio-(2-nitroetil) benceno (8)	66	40
	(Z)-4-(2-nitroetilfenil) acetamida (9)	78	30

Una vez finalizadas las reacciones y el proceso de *work-up*, los excesos de reactivo así como de intermedios de reacción fueron eliminados mediante cromatografía en columna (EP/AE 8:2). Por último, los productos ya purificados fueron analizados mediante espectroscopía ^1H RMN y ^{13}C .

En el espectro ^1H RMN, la presencia del producto de interés se evidencia por la aparición de dos tripletes a campo alto, con la consiguiente desaparición de los dobletes característicos de los protones olefínicos a campo bajo. El significado físico de lo anterior es que al perderse la insaturación, los protones metilénicos ahora poseen dos protones vecinos cada uno. Esto resulta en la aparición de señales triples en vez de dobles, y el corrimiento de señales de los protones del anillo aromático. El patrón de señales obtenido es coherente con lo esperado teóricamente según datos de tablas (fig. 3.7).

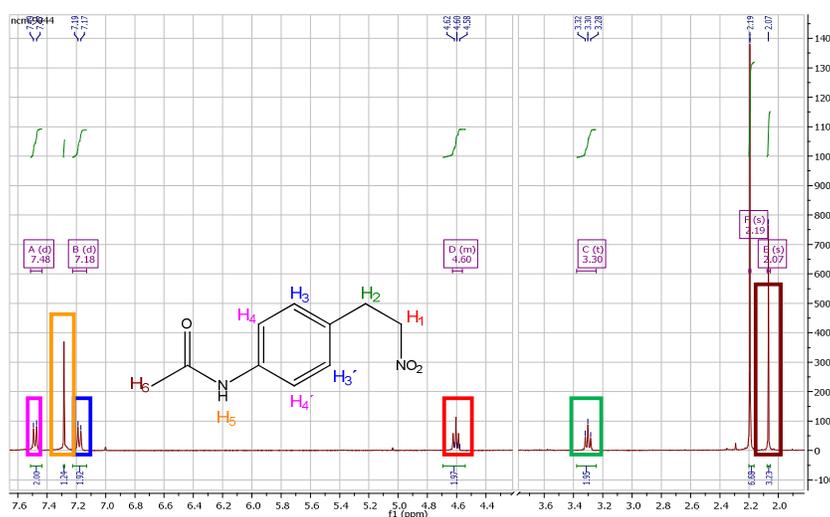


Figura 3.7: Espectro ^1H RMN de **9** adquirido a 23 °C, en DMSO- d_6 , a 400MHz con $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ como estándar interno.
Inserto: Estructura compuesto **9**.

En el espectro se pueden visualizar grupos de señales de baja intensidad a 3.2 y 4.6 ppm, lo cual comparado con los valores obtenidos de tablas, se correlaciona con la presencia de metilenos adyacentes a grupos aromáticos y a heteroátomos respectivamente [113]. Asimismo, el desdoblamiento de dichas

señales en tripletes, es coherente con lo esperable para grupos metileno. El estudio de la distribución de los carbonos, se realizó mediante experimentos HSQC y HMBC. A continuación, en la figura 3.8 se detallan los espectros de correlación obtenidos para el nitroalcano **9**. La señal observable a 2.2 ppm, está asociada directamente a un carbono que se desplaza a 24 ppm, y presenta acoplamiento con un carbono cuyo desplazamiento es de 168 ppm. Por lo tanto, este es el protón correspondiente al metilo del sustituyente acetamida.

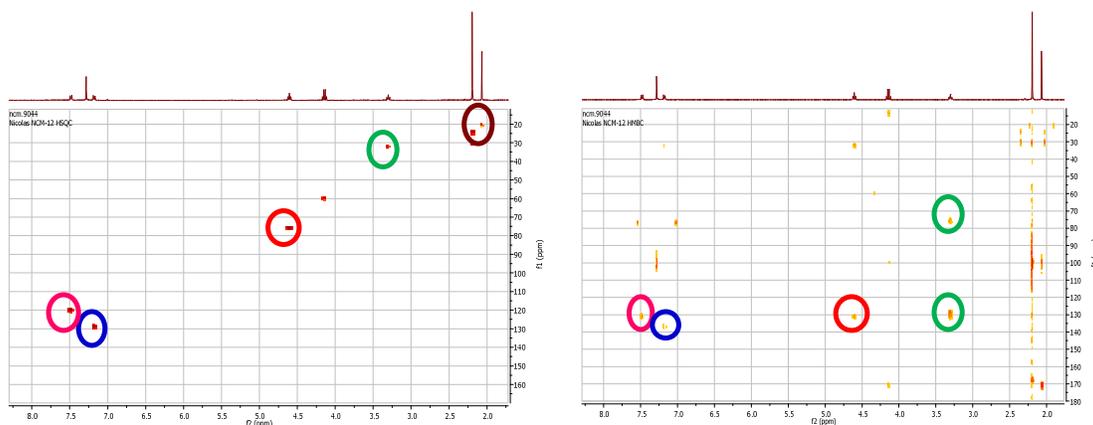


Figura 3.8: Los espectros de HMBC y HSQC para el compuesto **9**, fueron obtenidos a 23 °C en DMSO- d₆ con Si(CH₃)₄ como estándar interno **a)** Espectro HSQC, **Inserto:** Estructura compuesto **9** **b)** Espectro HMBC

3.2 ENSAYOS IN VITRO

3.2.1 Efecto de la exposición a radical peroxilo en la absorción UV-Vis

Una vez obtenidos los nitrocompuestos, se procedió al estudio de sus propiedades antioxidantes *in vitro*. El primer ensayo consistió en el análisis de los cambios espectrales, generados por radicales peroxilo, producto de la descomposición térmica de un azocompuesto, dihidrocloruro del 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP) (figura 3.9) [114].

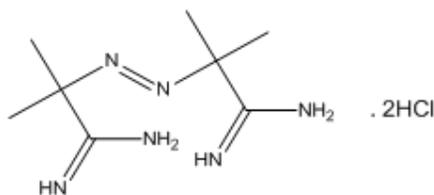
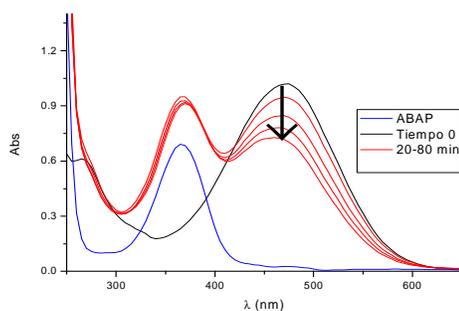


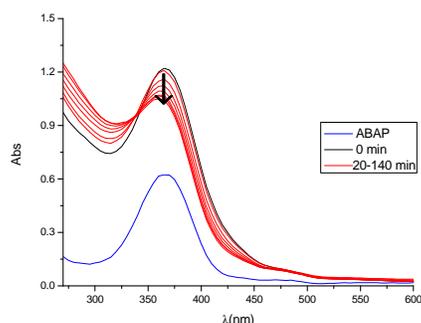
Figura 3.9: Estructura de ABAP

Para ello, se realizaron soluciones de los nitrocompuestos en concentraciones de 25 μM en buffer fosfato (75 mM, 0.1 mM DTPA, pH 7.4) y se observó su reacción con ABAP 30 mM durante 2 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. Durante ese tiempo, se obtuvieron espectros de absorción para estudiar el avance de la oxidación. En la figura 3.10, se muestran los espectros correspondientes a las diferentes series de nitroderivados estudiadas. Es notorio el decaimiento de la absorbancia con el tiempo de exposición al ABAP para todos los casos. Este hecho sugiere que los compuestos estarían experimentando una modificación química, la cual tiene efectos sobre su absorción de luz UV/Vis. En el caso del derivado dimetilamina (**1**), se observó un decaimiento cercano al 30% de su valor inicial, mientras que para los derivados metiltio y acetamida el decaimiento fue notoriamente inferior, (15 y 10%, respectivamente). La diferencia observada entre estos últimos y el derivado (**1**), podría estar indicando una diferencia en la cinética de reacción con las especies oxidantes. Para el derivado metiltio (**3**), además del decaimiento en su máximo de absorción, se observa la aparición de un punto isobéptico, lo cual podría representar la formación de un nuevo producto con un máximo de absorción menor.

a)



b)



c)

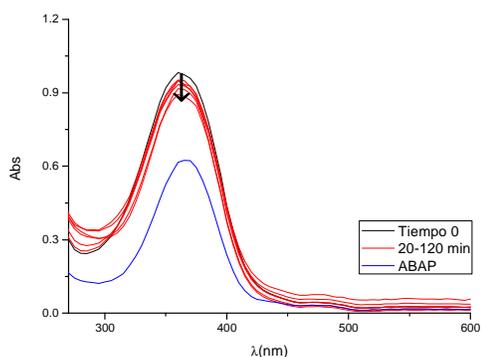


Figura 3.10: Efecto de la exposición a ABAP sobre los espectros de absorción. Los espectros fueron obtenidos entre $\lambda=200-600$ nm, previa y posterior exposición a ABAP 30 mM por 2 horas a 37 °C. En azul, el espectro correspondiente a ABAP. En negro, el espectro de las moléculas (25 μ M) luego del agregado de ABAP (Tiempo 0). En rojo, disminución de las bandas en función del tiempo. **a)** Espectro de derivado dimetilamino **(1)**, **b)** espectro de derivado metiltio **(3)**, **c)** espectro de derivado acetamida **(4)**.

3.2.2 Medida de la capacidad antioxidante

Para evaluar las propiedades antioxidantes de los compuestos, se utilizó la técnica por fluorescencia ORAC (sigla en inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity). En dicho ensayo, se cuantifica la capacidad de la molécula en estudio de ceder su protón lábil mediante un mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), tal como describen Huang D. y colaboradores [115, 116].

La oxidación de la fluoresceína se ve acelerada en la medida que hay menos cantidad de antioxidante. Dicho decaimiento se observa como un descenso más rápido de la fluorescencia. En la medida que el compuesto sea capaz de proteger eficientemente a la fluoresceína de la oxidación por ERO generadas por ABAP, se observa un aumento en el área bajo la curva (sumatoria de

valores normalizados de fluorescencia, ec. 3.1), que es directamente proporcional a la concentración de compuesto empleada. Posteriormente, se resta el área bajo la curva de la muestra con la del blanco para así obtener el área neta (ec. 3.2). Por último, al graficar área bajo la curva en función de las concentraciones empleadas, se obtiene una recta cuya pendiente es dividida por la pendiente de un compuesto de referencia (Trolox®), y se obtiene así un valor relativo (ec. 3.3).

$$ABC = 1 + \frac{F_1}{F_0} + \frac{F_2}{F_0} + \frac{F_3}{F_0} + \dots + \frac{F_i}{F_0} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

$$ABC_{\text{neta}} = ABC_{\text{muestra}} - ABC_{\text{blanco}} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

$$\text{Valor relativo de ORAC} = \frac{\text{Pendiente Compuesto}}{\text{Pendiente Trolox}} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

El compuesto de referencia utilizado para el experimento, es un análogo hidrosoluble de la vitamina E, Trolox®, con el cual se obtuvo una pendiente de 0.754 y un R^2 de 0.,995. Los resultados se informan como equivalentes de Trolox (Eq Tx).

A continuación a modo de ejemplo, se muestran el decaimiento de fluorescencia con sus respectivas curvas de calibración del derivado 6 (fig. 3.11).

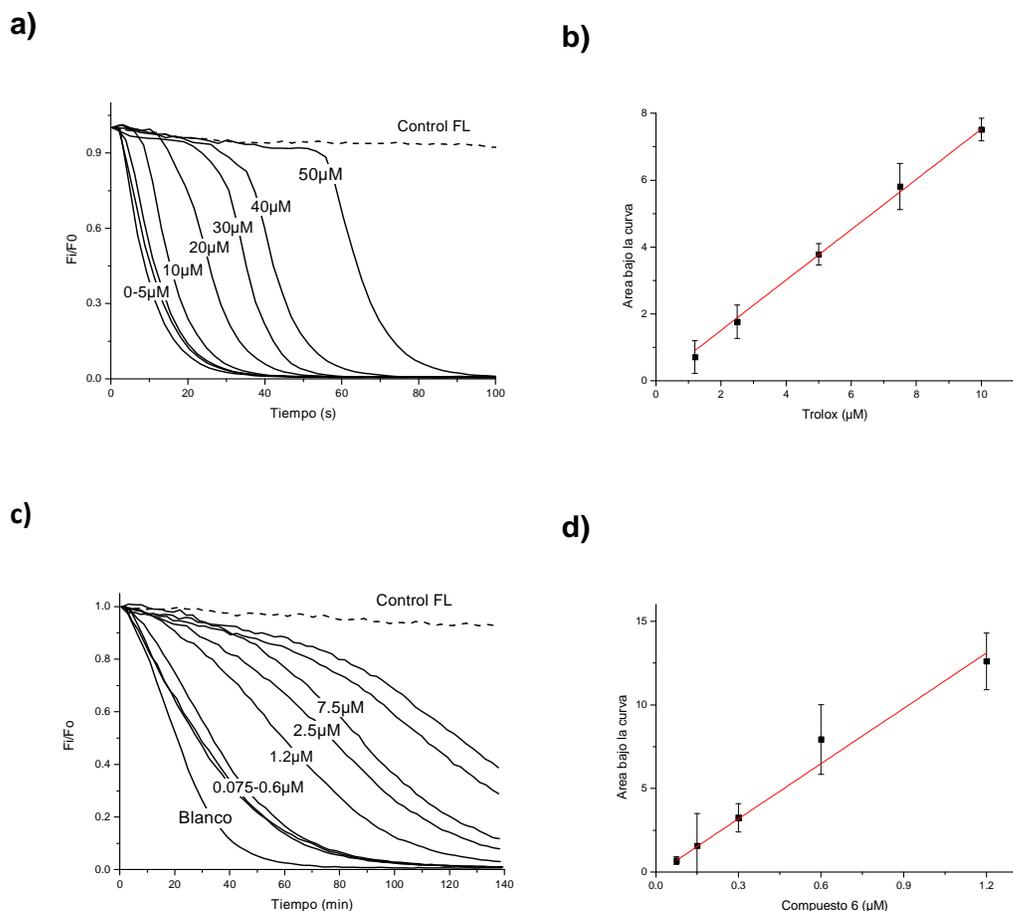
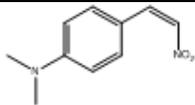
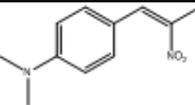
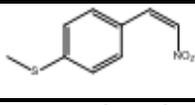
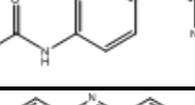
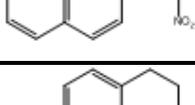
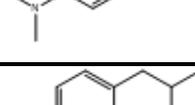
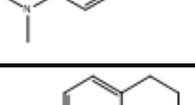
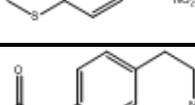


Figura 3.11: La capacidad de inhibir la oxidación de la fluoresceína 7.5 nM en presencia de ABAP 30 mM en buffer fosfato (75 mM, pH 7.4, 0.1 mM DTPA), fue medida a $\lambda_{\text{ex}} = 485\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 512\text{nm}$, a 37°C durante 140 minutos para los diferentes compuestos estudiados. En líneas punteadas, Control fluoresceína para cada experimento. **a)** compuesto de referencia Trolox (0-50 μM), **b)** curva de calibración Trolox; $y = 0.754x - 0.003$, $R^2 = 0.995$, **c)** compuesto 6 (0-25 μM); **d)** Ajuste para el compuesto 6; $y = 11.027x - 0.1292$, $R^2 = 0.989$

El decaimiento observado para las diferentes concentraciones, aporta una idea acerca de su actividad como agente antioxidante. Es importante destacar que los compuestos de la serie dimetilamina (derivados **1**, **6** y **7**), no mostraron un decaimiento a cero en los 140 minutos de duración del experimento para las concentraciones mayores, a diferencia del resto para los cuales se obtuvo una total inhibición en menos de 2 horas. Debido a esto, dichos valores no fueron tomados en cuenta para los cálculos de área bajo la curva, y fue necesario el empleo de concentraciones menores.

En la tabla 3.4 se muestran los valores ORAC de todos los compuestos desarrollados en este trabajo.

Tabla 3.4: Resultados de ORAC para todos los nitroalquenos y nitroalcanos desarrollados.

Estructura	Compuesto	Valor ORAC (Eq Tx)
	1	8 ± 1
	2	6 ± 1
	3	1.5 ± 0.2
	4	0.18 ± 0.02
	5	0.10 ± 0.05
	6	13 ± 2
	7	10 ± 1
	8	1.6 ± 0.3
	9	0.32 ± 0.04

En la tabla 3.4 se pueden observar valores de ORAC similares, mayores y menores que el compuesto de referencia (Trolox). Cabe destacar que los derivados dimetilamina (**1**, **2**, **6** y **7**) fueron los que presentaron la mejor capacidad antioxidante siendo entre 6 y 13 veces más activos que el compuesto de referencia Trolox. Por otra parte, los derivados metiltio (**3** y **6**) resultaron también más activos en un 50%. Cabe mencionar que en el caso de

los derivados dimetilamina, los nitroalcanos presentaron mayor actividad que los nitroalquenos. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre los nitroderivados metiltio (**3** y **8**) y los derivados acetamida.

Un análisis estructural del sistema en estudio, muestra dos posibles grupos capaces de reaccionar con las especies reactivas y de esa manera ejercer su rol antioxidante: el grupo nitroalifático y el sustituyente del anillo aromático en posición 4. Entre las moléculas más promisorias, se encuentran los derivados dimetilamina, cuyo grupo sustituyente presenta un fuerte carácter electrón-dador. Por otro lado, los compuestos que presentan sustituyentes de menor carácter electrón-dador como es el caso de los tioéteres y acetamida, resultaron tener una menor capacidad antioxidante, lo cual es consistente con descripciones previas de nuestro grupo. Esto evidencia la importancia de esta propiedad electrónica en el desarrollo de la actividad buscada.

Existen descripciones previas, donde se plantea la posible liberación de óxido nítrico por parte de nitroestirenos [91]. Como se detalló anteriormente, a pesar de ser un radical libre, el $\cdot\text{NO}$ posee una gran variedad de efectos beneficiosos para el organismo, entre los que destacan su capacidad antioxidante. Esto podría ser la explicación del mecanismo de protección a la oxidación de los compuestos en estudio.

En este sentido, cabe destacar que en nuestro grupo se ha estudiado la capacidad de liberación de óxido nítrico por parte de nitroalquenos aromáticos (Celano, L.; resultados no publicados), observándose liberación por parte del derivado **1** de cinética lenta (329 ± 9 nM/min). Asimismo, existen trabajos previos de nitrolípidos en donde se ensaya su posible generación de óxido nítrico para de esa manera funcionar como agentes vasodilatadores e inmunomoduladores [101, 102].

3.2.3 Análisis estructura-actividad

Como forma de racionalizar estructura-actividad antioxidante de los compuestos sintetizados, se estudió mediante cálculos teóricos las energías de los orbitales de frontera LUMO – HOMO, para evaluar su reactividad con radicales.

En primer lugar, se estudió la distribución de mapas de LUMO de nitroalcanos (fig. 3.12). En este sentido se observa claramente que el LUMO se encuentra ubicado en el derivado dimetilamina (**6**) en el agrupamiento etenilnitro en cambio en los casos de los metiltio y acetamido derivados (**8**) y (**9**) estos son mucho menores. Este hecho se correlaciona con que este agrupamiento actúa como electrófilo en el caso de recibir especies nucleofílicas como el radical OH^\cdot o desprotonarse para formar el ión nitronato que puede sufrir rearrreglo tipo Nef para liberar $\cdot\text{NO}$.

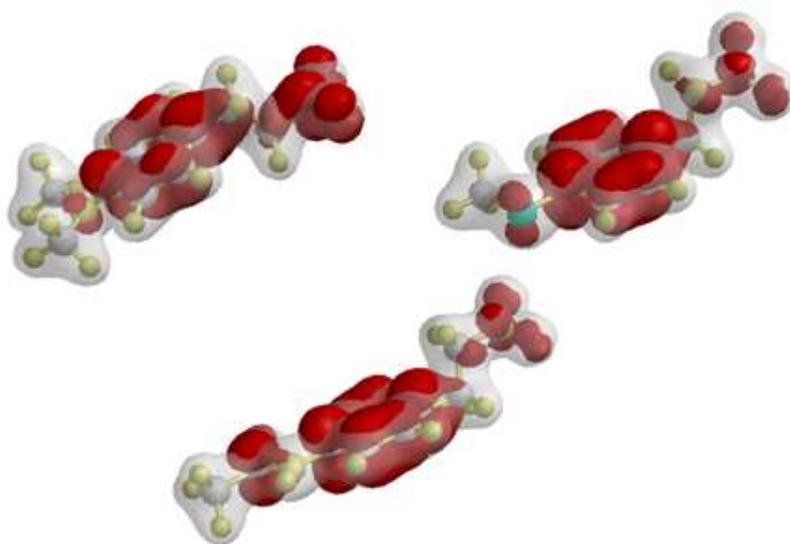


Fig. 3.12: Derivados de nitroalcanos **6** arriba izquierda, **8** arriba derecha y **9** abajo centro. Mapas de LUMO (rojo) graficados sobre densidad electrónica, determinado a nivel de AM1 a partir de estructuras MMFF.

En el caso de los derivados nitroalquenos este estudio arrojó que el LUMO se encontraba mejor distribuido en el agrupamiento nitroetenil en el caso de los derivados menos activos (**9**) y (**8**), lo que estaría en desacuerdo con la capacidad antioxidante observada. Esto podría indicar que en este caso la electrofilia del doble enlace contiguo al agrupamiento NO_2 no es la que gobierna la actividad. Es así que se plantea a través del ión nitronato intermedio que la reactividad del mismo viene dado por su electrofilia diferencial como lo muestran los mapas de LUMO (fig. 3.13).

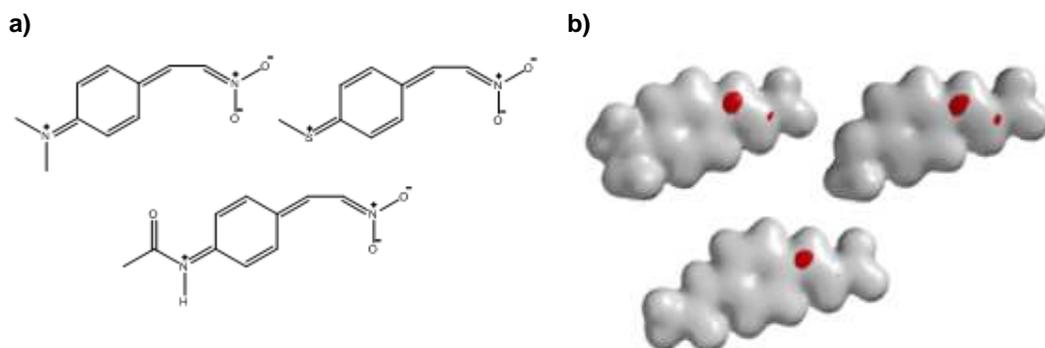


Fig. 3.13: a) Estructuras de iones nitronatos de **1** y **4**. b) Mapas de HOMO rojo) graficado sobre densidad electrónica, determinado a nivel de AM1 a partir de estructuras MMFF.

3.2.4 Protección de la oxidación de LDL

Dado que las series de derivados de dimetilamina y metiltio fueron las que mostraron mejores resultados en cuanto a la capacidad antioxidante, se estudió su potencial como inhibidores de la oxidación de LDL. Como se explicó anteriormente, la oxidación de esta proteína plasmática se encuentra en la base de la formación de las placas de ateroma, que conllevan a la generación de enfermedades como la aterosclerosis.

Para ello, la lipoproteína fue purificada de plasma humano mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad [117] y se utilizó el mismo generador de ERO empleado en el ensayo ORAC, el azocompuesto ABAP. El ensayo consistió en la exposición de la lipoproteína al oxidante durante diferentes tiempos, en presencia y ausencia de los compuestos, con el posterior agregado de *tert*-butil-hidroxitolueno (BHT) para detener la reacción. Un método sencillo para cuantificar la oxidación lipídica, es el descrito por Londero y colaboradores [118], en el cual se determina la generación de un producto minoritario de la lipoperoxidación, el malondialdehído (MDA). La reacción de este producto con ácido tiobarbitúrico (TBA) genera un aducto de color rosado, el cual puede ser detectado tanto por su absorción en el UV-visible como por su fluorescencia.

La presencia de productos de lipoperoxidación se estudió mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC), y los valores se expresan como micromoles por litro de malondialdehído ($\mu\text{mol/L}$ MDA). Los picos

correspondientes a MDA, se visualizaron como señales únicas a los 7 minutos de elución (fig. 3.14a). En la figura 3.14b se observa la curva de calibración realizada con *1,1,3,3-tetrametoxipropano* (TMTP) en concentraciones de 0.0625 a 10 μM . Si bien a la longitud de onda de trabajo los nitroalquenos ensayados absorben en bajas cantidades, los mismos eluyen a tiempos mayores que el TBARS dadas las condiciones de corrida. Por lo tanto, no se observaron interferencias de este tipo en la medida de interés.

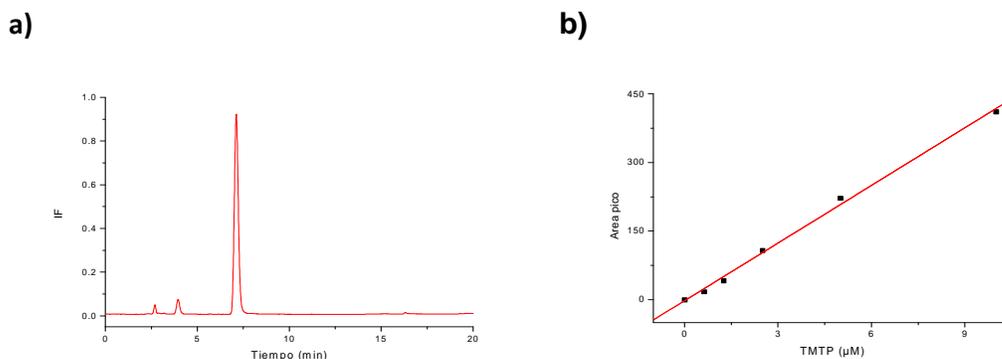


Fig. 3.14: a) Los cromatogramas de elución de TBARS, fueron obtenidos mediante HPLC, midiendo su absorción UV-vis ($\lambda = 532 \text{ nm}$) y su fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 553 \text{ nm}$). Las señales se visualizan como picos únicos a los 7 minutos de corrida en columna C-18, con un flujo de 0.5 mL/min, en fase móvil: buffer fosfato (10 mM, pH 6.8) / acetonitrilo / MeOH, 72%:11%:17% b) Curva de calibración llevada a cabo con TMTP en concentraciones utilizadas de 0, 0.0625, 0.125, 2.5, 5 y 10 μM ; $y = 42.06x - 2.44$, $R^2 = 0.996$.

En una primera aproximación, fueron seleccionados dos etenil-derivados, **1** y **3**, los cuales rindieron mejores resultados en el ensayo ORAC para estudiar la protección de LDL. La misma se indujo mediante la incubación con ABAP 30 mM a 37°C, en ausencia y presencia de los compuestos **1** y **3** (10 μM en buffer fosfato 10mM, pH 6.8). En presencia de nitroalquenos, los niveles de TBARS obtenidos fueron similares ($10.5 \pm 3.4 \mu\text{M}$ y de $11.8 \pm 1.3 \mu\text{M}$ para los nitroalquenos **1** y **3** respectivamente), y presentaron una disminución significativa cercana al 35 % ($p < 0.05$) respecto al control en ausencia de los mismos ($17.6 \pm 0.9 \mu\text{M}$), en 20 minutos de ensayo (fig. 3.15). En vista de los resultados obtenidos, se investigó a su vez la posible protección generada en 2 horas de experimento. Sin embargo, a dicho tiempo no se observó diferencias significativas entre los valores del control ABAP ($22 \pm 5 \mu\text{M}$) y las muestras con

nitroalquenos (18.6 ± 1.4 y $18.96 \pm 1.8 \mu\text{M}$ para **1** y **3** respectivamente), lo cual podría indicar que se alcanzó la fase de terminación de la peroxidación lipídica, o bien que los compuestos se consumieron en su totalidad. La concentración de ABAP empleada (30 mM), en medio acuoso y en presencia de proteínas, equivaldría aproximadamente a una generación de radicales peroxilo de $1.8 \mu\text{M}/\text{min}$ [119]. Por lo tanto, si los nitroalquenos ($10 \mu\text{M}$) reaccionaran de forma directa con los radicales provenientes de la descomposición del oxidante, los mismos se habrían consumido en 5.5 minutos de ensayo, lo que explicaría el porcentaje de oxidación (20-30%) encontrada a los 20 minutos. Como se esperaba a partir de lo observado a los 20 minutos, en 2 horas no existieron diferencias significativas entre las muestras tratadas con los compuestos y sin tratar, por lo que se realizarán experimentos a mayores concentraciones de compuesto. Adicionalmente, se empleará un generador de radicales liposoluble (por ejemplo el azocompuesto 2,2'-azobis-(2,4-dimetilvaleronitrilo), AMVN), además se seguirá el curso temporal de las reacciones, midiendo la velocidad de consumo de oxígeno, dado que la medida de formación de dienos conjugados a 234 nm tiene sus limitaciones en presencia de los nitrocompuestos que absorben a dicha longitud de onda.

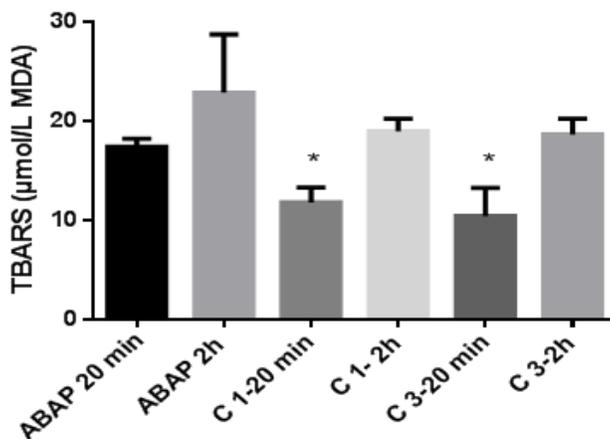


Fig. 3.15: Productos de oxidación de la LDL, luego de exposición a ABAP 30 mM por 2 h a 37 °C, en presencia y ausencia de compuestos **1** y **3** en concentraciones $10 \mu\text{M}$, en DMSO 5%. Los valores obtenidos, se midieron por su absorción UV-vis ($\lambda=532 \text{ nm}$) y su fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 553 \text{ nm}$), y se expresan como $\mu\text{mol}/\text{L}$ MDA. Los valores se expresan como media \pm desvío estándar de triplicados. Se observaron diferencias significativas en ausencia y presencia de nitroalquenos, * $p < 0.05$, $n=3$

❖ 4. Conclusiones

En el presente trabajo se sintetizaron y caracterizaron fisicoquímicamente nueve compuestos nitroalifáticos aromáticos para ser testados en cuanto a su capacidad antioxidante, y eventualmente ser utilizados en estudios posteriores como potenciales fármacos. Todos los compuestos fueron obtenidos con buenos rendimientos, en una sola etapa sin productos secundarios.

Por otra parte, es de destacar la buena capacidad antioxidante obtenida para los derivados dimetilamina, incluso superando en 8 y 13 veces los valores obtenidos para el compuesto de referencia, Trolox. A su vez, se observó una importante variación en su espectro de absorción en tiempos de 20 minutos de exposición a ABAP. Un cambio estructural involucrado en su actividad como antioxidante, es una posible explicación a dicho decaimiento. La actividad antioxidante de estas moléculas puede estar dada por diversas características estructurales. Entre ellas, la presencia de grupos electrofílicos capaces de aceptar electrones desapareados de especies radicalares, y la liberación de óxido nítrico son mecanismos razonables.

Los derivados metiltio y dimetilamina se comportaron como protectores efectivos al prevenir la oxidación de LDL por parte del ABAP, reduciendo en más de un 60% los niveles de TBARS en concentraciones de 10 μM (10 nmol/mL), cuando la generación de radicales por parte del ABAP llegaría a 36 nmol/mL a los 20 min. Por otro lado, los resultados son llamativos dado que el metiltio derivado, que había demostrado una actividad menor al dimetilamino como agente antioxidante en el ensayo ORAC (1.5 vs 8 EqTx), demostró en este caso un nivel de protección similar al que presentan los nitroalquenos derivados de dimetilamina. Esta última observación podría deberse a un cambio en la reactividad del compuesto con los radicales en función a las características del medio de reacción.

❖ . Materiales y métodos

Consideraciones generales de los procedimientos de síntesis

Los disolventes se purifican y secan, previo a su utilización, por métodos convencionales [86]. Otros reactivos fueron adquiridos en empresas comerciales y usados sin purificación. Los grados de avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinan por TLC. Se usa sílicagel con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Alugram® Sil G/UV254). Las fases móviles usadas han sido mezclas (en distintas proporciones) de acetato de etilo, éter de petróleo y éter etílico, éter de petróleo. Los cromatogramas se revelan por alguno de los siguientes métodos:

- Exposición a la luz ultravioleta (254 nm)
- Exposición a vapores de yodo
- 2,4-dinitofenilhidrazina (reactivo de Brady)

Para las cromatografías en columna, se utiliza sílicagel (Kieselgel, tamaño 0.063-0.2 mm, J. T. Baker). Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se realizan en un equipo Bruker DPX 400 (400 MHz y 100 MHz, respectivamente), utilizando los disolventes indicados y $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico son descritos en unidades de δ (ppm) y las multiplicidades según s: singulete, d: doblete, dd: doblete de doblete, t: triplete, m: multiplete. Los espectros de masas por impacto electrónico (IE) se realizan en un equipo Shimadzu GCMS QP 1100 EX a un potencial de ionización de 70 eV ó 20 eV por inyección directa. Los espectros de masa por electrospray (ESI) se realizan en un equipo Hewlett Packard 1100 MSD.

Síntesis de nitroalquenos

(Z)-N,N'-dimetilamino-4-(1-etenil-2-nitro)-benceno (1)

En un balón de 25 mL se colocan 0.78 g de *p*-dimetilaminobenzaldehído (5 mmol) y 0.67 g de nitrometano (11 mmol) en 5 mL de EtOH anhidro y 0.12 mL de *n*-butilamina. Se calienta a reflujo durante 2 horas hasta observar

desaparición del aldehído. El producto se filtra y se lava exhaustivamente con éter de petróleo obteniéndose un sólido rojo (0.3g, rendimiento 30%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8.00 (d, 1H, *J*=12.00 Hz), 7.53 (d, 1H, *J*= 12.00 Hz), 7.45 (d, 2H, *J*= 8.00 Hz), 6.60 (d, 2H, *J*= 8.00 Hz), 3.10 (s, 6H). MS (IE, 70 eV) *m/z* (abundancia): 192 (M⁺•, 100%), 162 (2.30%), 145 (100%), 130 (20.3%), 77,0 (9.40%).

(Z)-N,N-dimetilamino-4-(2-nitroprop-1-enil)-benceno (2)

En un balón de 25 mL se colocan 2.0 g de *p*-dimetilaminobenzaldehído (13 mmol) y 2.09 g de nitroetano (28 mmol) en 5 mL de EtOH anhidro y 0.12 mL de *n*-butilamina. Se calienta a reflujo durante 15 horas hasta la desaparición del aldehído visualizado por TLC (EP:AE/8:2). El producto se filtra y lava exhaustivamente con éter de petróleo obteniéndose un sólido naranja (1.25 g, rendimiento 70.5%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz) δ (ppm): 8.11 (s, 1H), 7.43 (d, 2H, *J*=8.6 Hz), 6.74 (d, 2H, *J*= 8.6 Hz), 3.07 (s, 6H), 2.52 (s, 3H). MS (IE, 70 eV) *m/z* (abundancia): 206 (M⁺•, 85.5%), 159 (100%), 149 (4.80%), 144(49.2%), 121 (12.1%), 115 (31.5%), 91,0 (7.30%), 77,0 (5.60%).

(Z)-(1-etenil-2-nitro)-4-metiltiobenceno (3)

Se agregan 0.2 g (0.8 mmol) de 4-metiltiobenzaldehído a una mezcla de 3 mL de nitrometano anhidro y 0.062 g (0.8 mmol) de acetato de amonio. La mezcla se agita a 100 °C durante 2 horas, hasta la desaparición del aldehído evidenciado por TLC (EP:AE 8:2). El disolvente es luego evaporado a vacío y se agrega agua y acetato de etilo, en proporción 9:1. La capa orgánica se lava con agua (2 x 50 mL), HCl 1M (2 x 25 mL) y solución saturada de NaCl. Luego se evapora el disolvente a vacío y se obtiene un sólido amarillo. (0.11 g, rendimiento 60.6%) ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.99 (d, 1H, *J*= 12.00 Hz) 7.47 (d, 2H, *J*= 8.00 Hz), 7.58 (d, 1H, *J*= 12.00 Hz), 7.29 (d, 1H, *J*=8.00 Hz), 2.55 (s, 3H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 145.01, 138.62, 136.07, 129.05, 125.28, 13.98.

(Z)-4-(1-etenil-2-nitrofenil)-acetamida (4)

Se agregan 0.133 g (0.8 mmol) de 4-acetamidobenzaldehído en una mezcla de 3 mL de nitrometano anhidro y 0.062 g (0.8 mmol) de acetato de amonio. La mezcla se agita a 100°C durante 2 horas, hasta la desaparición del aldehído evidenciado por TLC (EP:AE 8:2). El disolvente se evapora a vacío y se agrega agua y acetato de etilo en proporción 9:1. La capa orgánica se lava con agua (2 x 50 mL), HCl (2 x 25 mL) y solución saturada de NaCl. Por último se evapora el disolvente a vacío, obteniéndose un sólido amarillo. (0.1g, rendimiento 78.1%) ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.69 (d, 2H, J=12.00Hz), 7.62 (d, 2H, J=12.00Hz), 7.36 (d, 1H, J=8.00 Hz), 7.25 (d, 1H, J=8.00 Hz), 2.06 ppm (s). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 168.9, 142.8, 138.82, 130.92, 124.4, 118.50, 39.51

(Z)-2-(1-etenil-2-nitro)-quinolina (5)

Se agregan 0.126 g (0.8 mmol) de 1-quinolincarboxialdehído en una mezcla de 3 mL de nitrometano anhidro y 0.062 g (0.8 mmol) de acetato de amonio. La mezcla se agita a 100°C durante 2 horas, hasta la desaparición del aldehído evidenciado por TLC (EP:AE/ 7:3). El disolvente es evaporado a vacío y se agrega y acetato de etilo en proporción 9:1. La capa orgánica se lava con agua (2 x 50 mL), luego se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida para obtener un sólido amarillo (0.019g, rendimiento 14.8%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 9.05 (d, 1H J = 4.00 Hz), 8.48, (d, 1H J= 8.00 Hz), 8.19 (d, 1H, J= 8.00 Hz), 8.08 (d, 1H, J = 8.00Hz), 7.90 (t, 1H, J= 12.00 Hz) 7.80 (t, 1H, J= 12.00 Hz), 7.67 (dd, 1H, J= 8.00 Hz), 7.44 (d, 1H, J= 8.00 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 150.09, 130.18, 129.91, 128.60, 125.37, 120.05, 99.94, 77.02

Síntesis de nitroalcanos

1-dimetilamino-4-(2-nitroetil)-benceno (6)

En un balón de 25 mL se coloca 0.1 g de **1** (0.5 mmol), 1.6 mL de THF y 0.2 mL de MeOH. La solución se enfría a 0°C y se agregan en cuatro porciones 0.09 g de NaBH₄ (2.5 mmol). Después del agregado del agente reductor la solución se agita a temperatura ambiente durante 40 minutos. El disolvente se destila a

presión reducida. Se agregan 10 mL de solución saturada de NaCl y se extrae con Et₂O (3 x 5 mL). La capa orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro y se destila el disolvente. Se purifica mediante columna cromatográfica (EP/AE 9:1). Se obtiene un sólido amarillo. (0.03 g, rendimiento 86.2%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 6.70 (d, 2H, *J*= 8.00 Hz), 4.56 (t, 2H, 1*J*= 14.0 Hz, 2*J*= 7.20 Hz), 3.24 (t, 2H, 1*J*= 14.0 Hz, 2*J*= 7.20 Hz), 2.94 (s, 6H), 7.08 (d, 2H, *J*= 8.00 Hz), ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 149.76, 129.03, 122.51, 112.18, 76.52, 40.32, 32.27

1-dimetilamino-4-(2-nitropropil)-benceno (7)

En un balón de 25 mL se colocan 0.05 g (0.26 mmol) de **2**, 1.0 mL de THF y 0.1 mL de MeOH. La solución se enfría a 0 °C y se agregan en cuatro porciones 0.015 g NaBH₄ (0.4 mmol). Después del agregado del agente reductor la solución se agita a temperatura ambiente durante 40 minutos. El disolvente se destila a presión reducida. Se agregan 10 mL de solución saturada de NaCl y se extrae con Et₂O (3 x 5 mL). La capa orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro y se destila el disolvente. Se purifica mediante columna cromatográfica (EP/AE 9:1). Se obtiene un sólido amarillo (0.03 g, rendimiento 61.2%) ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.08 (d, 2H, *J*=8.40 Hz), 6.70 (d, 2H, *J*= 8.80 Hz), 4.56 (t, 2H, *J*=7.60 Hz), 3.25 (t, 2H, *J*=7.60 Hz), 2.94 (s, 6H).

1-metiltio-(2-nitroetil)-benceno (8)

En un balón de 25 mL se colocan 0.05 g (0.32 mmol) de **3**, 1.0 mL de THF y 0.1 mL de MeOH. La solución se enfría a 0°C a lo que se agregan en 4 porciones 0.015 g de NaBH₄ (0.4 mmol). Luego del agregado del agente reductor la solución se agita a temperatura ambiente durante 40 minutos. El disolvente se destila a presión reducida. Se agregan 10 mL de solución saturada de NaCl y se extrae con Et₂O (3 x 5 mL). La capa orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro y se destila el disolvente. Se purifica mediante columna cromatográfica de sílica gel (EP/AE 7:3). Se obtiene un aceite amarillo (0.031g, rendimiento 86%) ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.23 (d, 2H, *J*= 12.00 Hz), 7.08 (d, 2H, *J*= 12.00Hz), 4.94 (m, 2H), 3.17 (m, 2H), 2.50 (s, 3H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 140.0, 128.78, 126.80, 130.22, 76.98, 14.09

(Z)-4-(2-nitroetilfenil)-acetamida (9)

En un balón de 25 mL se colocan 0.24 mmol (0.05 g) de **5**, 1.0 mL de THF y 0.1 mL de MeOH. La solución se enfría a 0°C a la que se agregan en 4 porciones 0.015 g de NaBH₄ (0.4 mmol). Después del agregado del agente reductor la solución se agita a temperatura ambiente durante 40 minutos. El disolvente se destila a presión reducida. Se agregan 10 mL de solución saturada de NaCl y se extrae con Et₂O (3 x 5 mL). La capa orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro y se destila el disolvente a presión reducida. Se purifica mediante cromatografía en columna (EP/AE 8:2) (0.0343g, rendimiento 78%) ¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 7.48 (d, 2H, J=8.00 Hz), 7.18 (d, 2H, J=8.00 Hz), 4.60 (t, 2H, J=8.00 Hz), 3.30 (t, 2H, J=8.00 Hz), 2.18 (s, 3H). ¹³C-RMN (DMSO d₆, 100MHz) δ (ppm): 168.33, 131, 129.38, 75.97, 32.30, 24.56

Efecto de la exposición a radical peroxilo en la absorción UV-Vis

Para el estudio de los cambios espectrales de los compuestos por exposición a radical peroxilo, se utilizó ABAP como generador de radicales. Los compuestos fueron solubilizados en DMSO, y posteriormente diluidos a la concentración de trabajo (25 μM) en buffer fosfato 75 mM, 0.1mM DTPA, pH 6.8. Se expuso las muestras a ABAP 30 mM, durante 2 horas a 37 °C, y se realizaron espectros de las muestras cada 20 minutos

Medida de la capacidad antioxidante mediante técnica de ORAC

Para la misma se utilizó fluoresceína a una concentración de 7.5 nM, y como agente iniciador del proceso oxidativo, ABAP a una concentración de 30 mM. El mismo fue preparado al momento de utilizar. Todas las soluciones se prepararon en buffer fosfato 75 mM, 0.1 mM de ácido dietilenotriaminopentaacético, pH 7.4, siendo este el disolvente utilizado en el ensayo.

Para la curva de calibración se utilizó como referencia Trolox, en concentraciones de 0, 0.15; 0.3; 0.6; 1.2; 2.5; 5.0; 10.0; 15.0; 20.0; 25.0; 50.0 μM. Las reacciones se llevaron a cabo a 37 °C, en una mezcla de reacción ajustada a 200 μL de volumen final. Dicha mezcla contiene (en dicho orden): el

agente a estudiar la capacidad antioxidante (0; 0.15; 0.3; 0.6; 1.2; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0; 15; 20.0; 25.0 μM), buffer fosfato, fluoresceína y ABAP (el cual se agrega al momento de la medida). Se registran los valores de fluorescencia correspondientes a 60 medidas realizadas cada 2 minutos en un equipo Varioskan Flash (Thermo, Vantaa, Finland), con un $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, y un $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$. A partir de dichos datos, se calculan las áreas bajo la curva de decaimiento fluorescente para cada concentración, según la siguiente ecuación:

$$ABC = 1 + \frac{F_1}{F_0} + \frac{F_2}{F_0} + \frac{F_3}{F_0} + \dots + \frac{F_i}{F_0} \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

en donde f_0 es la fluorescencia medida a tiempo cero y f_i la fluorescencia medida a tiempo i .

A partir de este valor, se calcula el área neta, como la diferencia entre el área bajo la curva de compuesto a analizar y la del blanco:

$$ABC_{\text{neta}} = ABC_{\text{muestra}} - ABC_{\text{blanco}} \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

Posteriormente, los valores de regresión obtenidos, se grafican en función de la concentración de compuesto, de donde se obtienen las pendientes. El valor de ORAC se expresa en términos relativos a Trolox®, como el cociente entre las pendientes del compuesto X y la de Trolox®.

La forma de la ecuación final es:

$$\text{Valor relativo de ORAC} = \frac{\text{Pendiente Compuesto}}{\text{Pendiente Trolox}} \quad (\text{Ecuación 5.3})$$

Purificación y oxidación de la LDL

La purificación de lipoproteína de baja densidad (LDL) se realiza a partir de plasma humano fresco mediante un proceso de ultracentrifugación en gradiente de densidad. Para generar el gradiente, se aumenta la densidad del plasma mediante el agregado de KBr, en una proporción de 0.28 g por mL de plasma. Luego de agitación por algunos minutos se obtiene una solución homogénea. Una vez densificado el plasma, el mismo es vertido en tubos de

ultracentrifugación, y se agrega por las paredes del tubo NaCl 0.15 M, hasta el llenado del mismo. Posteriormente, se realiza ultracentrifugación a 55000 rpm, a una temperatura de 4 °C, durante 90 minutos. Se separa la banda de color naranja que se observa en el tercio superior del tubo evitando arrastrar fracciones superiores. Por último, se mide la concentración proteica a 280 nm ($\epsilon = 1\text{mg/mL}$), y la LDL purificada se almacena a 4 °C. Al momento del ensayo de oxidación, una alícuota de la proteína es diluida al décimo, para una concentración final de 0.2 mg/mL aproximadamente. Se divide la proteína en fracciones, que incluyen:

- Control de BHT
- Control de autooxidación (blanco)
- Muestras problema conteniendo el compuesto en estudio.

Se agregan a cada tubo 100 μL de ABAP para una concentración final de 30 mM, y se toman alícuotas cada 20 minutos, hasta completar las 2 horas.

Los compuestos se solubilizan en DMSO, a una concentración stock de 0.5 mM, para posterior dilución a una concentración en buffer fosfato 10 mM, pH 6.8.

Ensayo TBARS

En este ensayo se mide la presencia de productos de lipoperoxidación, mediante la reacción de dichos productos con ácido tiobarbitúrico. Los aductos generados por dicha reacción desarrollan una coloración rosada, la cual es posible medir tanto por absorbancia a 532 nm, como por fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 515\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 553\text{nm}$). Para el desarrollo de esta técnica, se preparan las soluciones de la curva de calibración con TMTP y las muestras problema en diluciones correspondientes, con un volumen final de 50 μL . Luego se agrega a cada muestra 150 μL de solución TBAR y 150 μL de ácido acético 20% y se agita. Las muestras son incubadas a 80 °C por 1 hora, luego de lo cual se deja enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregan 300 μL de MeOH calidad HPLC y 100 μL de ácido tricloroacético), seguido de una centrifugación a 13000 g durante 10 minutos. Por último, se extrae el sobrenadante. Los

productos se separan empleando una columna de fase reversa (C-18), en una fase móvil de 0.01 M fosfato de sodio pH 6.8/ MeOH/ acetonitrilo (72:17:11), a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min, con detección por absorbancia en el visible o por fluorescencia. Para estos estudios contamos con un equipo de HPLC 1260 Infinity (Agilent Technologies, Alemania), equipado con detectores UV-vis y de fluorescencia. El nivel de lipoperoxidación se expresa como micromoles de malondialdehído por mol ($\mu\text{mol MDA/L}$).

Análisis estructura-actividad

El análisis estructura-actividad fue llevado a cabo mediante el software Spartan Pro [®], a nivel semiempírico AM1, a partir de estructuras parametrizadas mediante campos de fuerza MMFF.

Estadística

Las muestras fueron analizadas por triplicado para todos los casos, y los valores se expresan como promedio \pm desvío estándar. El grado de significancia fue analizado mediante test ANOVA, tomando como valor significativo $p < 0.05$.

❖ 6. Referencias

1. Halliwell, B., *Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life*. Plant Physiol. , 2006. **141**(2): p. 312-322.
2. Turrens, J., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol. , 2003. **552 (Pt 2)**: p. 3344.
3. Al Ghoul, I., N.K. Khoo, U.G. Knaus, K.K. Griendling, R.M. Touyz, V.J. Thannickal, A. Barchowsky, W.M. Nauseef, E.E. Kelley, P.M. Bauer, V. Darley-Usmar, S. Shiva, E. Cifuentes-Pagano, B.A. Freeman, M.T. Gladwin, and P.J. Pagano, *Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(7): p. 1271-88.
4. Bretón-Romero, R., C. González de Orduña, N. Romero, F.J. Sánchez-Gómez, C. de Álvaro, A. Porras, F. Rodríguez-Pascual, J. Laranjinha, R. Radi, and S. Lamas, *Critical role of hydrogen peroxide signaling in the sequential activation of p38 MAPK and eNOS in laminar shear stress*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(6): p. 1093-100.
5. Koppenol, W.H., *The Haber-Weiss cycle--70 years later*. Redox Report, 2001. **6**(4): p. 229-34.
6. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature 2001. **414**: p. 813-820.
7. Kelley, E.E., N.K. Khoo, N.J. Hundley, U.Z. Malik, B.A. Freeman, and M.M. Tarpey, *Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(4): p. 493-8.
8. Pryor, W.A., J.N. Lemercier, H. Zhang, R.M. Uppu, and G.L. Squadrito, *The catalytic role of carbon dioxide in the decomposition of peroxyxynitrite*. Free Radic Biol Med, 1997. **23**(2): p. 331-8.
9. Denicola, A., B.A. Freeman, M. Trujillo, and R. Radi, *Peroxyxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxyxynitrite-mediated oxidations*. Arch Biochem Biophys, 1996 **333**(1): p. 49-58.
10. Fang, F.C., *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(10): p. 820-32.
11. Rubbo, H., R. Radi, M. Trujillo, R. Telleri, B. Kalyanaraman, S. Barnes, M. Kirk, and B.A. Freeman, *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxyxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. J Biol Chem, 1994. **269**(42): p. 26066-75.
12. Rubbo, H., S. Parthasarathy, S. Barnes, M. Kirk, B. Kalyanaraman, and B.A. Freeman, *Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. Arch Biochem Biophys, 1995. **324**(1): p. 15-25.
13. Moller, M., H. Botti, C. Batthyany, H. Rubbo, R. Radi, and A. Denicola, *Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 8850-4.

14. Ignarro, L.J., R.G. Harbison, K.S. Wood, and P.J. Kadowitz, *Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid*. J Pharmacol Exp Ther, 1986. **237**(3): p. 893-900.
15. Ignarro, L.J., G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns, and G. Chaudhuri, *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
16. Keshari, R.S., A. Jyoti, M. Dubey, N. Kothari, M. Kohli, J. Bogra, M.K. Barthwal, and M. Dikshit, *Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48111.
17. Alvarez, M.N., G. Peluffo, L. Piacenza, and R. Radi, *Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized Trypanosoma cruzi: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity*. J Biol Chem, 2011. **286**(8): p. 6627-40.
18. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
19. Jones, D.P., *Redefining oxidative stress*. Antioxid Redox Signal, 2006(9-10): p. 1865-79.
20. Wiseman, H. and B. Halliwell, *Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer*. Biochem J, 1996. **313 (Pt 1)**: p. 17-29.
21. Jena, N.R., *DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair*. J Biosci, 2012. **37**(3): p. 503-17.
22. Quijano, C., B. Alvarez, R.M. Gatti, O. Augusto, and R. Radi, *Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups*. Biochem J, 1997. **322 (Pt 1)**: p. 167-73.
23. Alvarez, B. and R. Radi, *Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins*. Amino Acids, 2003(3-4): p. 295-311.
24. Cassina, A.M., R. Hodara, J.M. Souza, L. Thomson, L. Castro, H. Ischiropoulos, B.A. Freeman, and R. Radi, *Cytochrome c nitration by peroxynitrite*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21409-15.
25. Blanchard-Fillion, B., J.M. Souza, T. Friel, G.C. Jiang, K. Vrana, V. Sharov, L. Barron, C. Schoneich, C. Quijano, B. Alvarez, R. Radi, S. Przedborski, G.S. Fernando, J. Horwitz, and H. Ischiropoulos, *Nitration and inactivation of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 46017-23.
26. Parastatidis, I., L. Thomson, A. Burke, I. Chernysh, C. Nagaswami, J. Visser, S. Stamer, D.C. Liebler, G. Koliakos, H.F. Heijnen, G.A. Fitzgerald, J.W. Weisel, and H. Ischiropoulos, *Fibrinogen beta-chain tyrosine nitration is a prothrombotic risk factor*. J Biol Chem, 2008. **283**(49): p. 33846-53.
27. Zheng, L., B. Nukuna, M.L. Brennan, M. Sun, M. Goormastic, M. Settle, D. Schmitt, X. Fu, L. Thomson, P.L. Fox, H. Ischiropoulos, J.D. Smith, M. Kinter, and S.L. Hazen, *Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in*

- subjects with cardiovascular disease*. J Clin Invest, 2004. **114**(4): p. 529-41.
28. Thomson, L., M. Tenopoulou, R. Lightfoot, E. Tsika, I. Parastatidis, M. Martinez, T.M. Greco, P.T. Doulias, Y. Wu, W.H. Tang, S.L. Hazen, and H. Ischiropoulos, *Immunoglobulins against tyrosine-nitrated epitopes in coronary artery disease*. Circulation, 2012. **126**(20): p. 2392-401.
 29. Thomson, L., J. Christie, C. Vadseth, P.N. Lanken, X. Fu, S.L. Hazen, and H. Ischiropoulos, *Identification of immunoglobulins that recognize 3-nitrotyrosine in patients with acute lung injury after major trauma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(2): p. 152-7.
 30. Dillard, C.J. and A.L. Tappel, *Lipid peroxidation products in biological tissues*. Free Radic Biol Med, 1989. **7**(2): p. 193-6.
 31. Esterbauer H, S.R., Zollner H., *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. Free Radic Biol Med. , 1991. **11**(1): p. 81-128.
 32. Vladykovskaya, E., S.D. Sithu, P. Haberzettl, N.S. Wickramasinghe, M.L. Merchant, B.G. Hill, J. McCracken, A. Agarwal, S. Dougherty, S.A. Gordon, D.A. Schuschke, O.A. Barski, T. O'Toole, S.E. D'Souza, A. Bhatnagar, and S. Srivastava, *Lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes endothelial activation by inducing endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2012. **287**(14): p. 11398-409.
 33. Winger, A.M., N.L. Taylor, J.L. Heazlewood, D.A. Day, and A.H. Millar, *The Cytotoxic lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal covalently modifies a selective range of proteins linked to respiratory function in plant mitochondria*. J Biol Chem, 2007. **282**(52): p. 37436-47.
 34. Chapple, S.J., X. Cheng, and G.E. Mann, *Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease*. Redox Biol, 2013. **1**(1): p. 319-331.
 35. Cline, S.D., J.N. Riggins, S. Tornaletti, L.J. Marnett, and P.C. Hanawalt, *Malondialdehyde adducts in DNA arrest transcription by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(19): p. 7275-80.
 36. VanderVeen, L.A., M.F. Hashim, Y. Shyr, and L.J. Marnett, *Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 14247-52.
 37. Fink, S.P., G.R. Reddy, and L.J. Marnett, *Mutagenicity in Escherichia coli of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8652-7.
 38. Seljeskog, E., T. Hervig, and M.A. Mansoor, *A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit*. Clin Biochem, 2006. **39**(9): p. 947-54.
 39. Henkel, R.R., *Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility*. Asian J Androl, 2011. **13**(1): p. 43-52.
 40. Doyle, H.A. and M.J. Mamula, *Posttranslational protein modifications: new flavors in the menu of autoantigens*. Curr Opin Rheumatol, 2002. **14**(3): p. 244-9.

41. Sandhu, J.K., *Distribution of protein nitrotyrosine in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. J Rheumatol., 2003. **30**(6): p. 1173-81.
42. Loeser, R.F., et. al., *Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1*. Arthritis Rheum., 2002. **46**(5): p. 2349-57.
43. Ohmori, H., M. Oka, Y. Nishikawa, H. Shigemitsu, M. Takeuchi, M. Magari, and N. Kanayama, *Immunogenicity of autologous IgG bearing the inflammation-associated marker 3-nitrotyrosine*. Immunol Lett, 2005. **96**(1): p. 47-54.
44. Heinecke, J.W., *Lipoprotein oxidation in cardiovascular disease: chief culprit or innocent bystander?* J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 813-6.
45. Viola, M., B. Bartolini, D. Vigetti, E. Karousou, P. Moretto, S. Deleonibus, T. Sawamura, T.N. Wight, V.C. Hascall, G. De Luca, and A. Passi, *Oxidized LDL affects hyaluronan synthesis in human aortic smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2013.
46. Tang, W.H., *Targeting endogenous antioxidants to prevent cardiovascular diseases*. J Am Heart Assoc, 2012. **1**(6): p. e005215.
47. Choi, J.H., J.Y. Yoo, S.O. Kim, S.E. Yoo, and G.T. Oh, *KR-31543 reduces the production of proinflammatory molecules in human endothelial cells and monocytes and attenuates atherosclerosis in mouse model*. Exp Mol Med, 2012. **44**(12): p. 733-9.
48. Li, D. and J.L. Mehta, *Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(4): p. 1116-22.
49. Denicola, A., C. Batthyany, E. Lissi, B.A. Freeman, H. Rubbo, and R. Radi, *Diffusion of nitric oxide into low density lipoprotein*. J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 932-6.
50. Schuster, B., R. Prassl, F. Nigon, M.J. Chapman, and P. Laggner, *Core lipid structure is a major determinant of the oxidative resistance of low density lipoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2509-13.
51. Canton, J., D. Neculai, and S. Grinstein, *Scavenger receptors in homeostasis and immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(9): p. 621-34.
52. Li, H., M.I. Cybulsky, M.A. Gimbrone, Jr., and P. Libby, *An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium*. Arterioscler Thromb, 1993. **13**(2): p. 197-204.
53. Poston, R.N. and R.R. Johnson-Tidey, *Localized adhesion of monocytes to human atherosclerotic plaques demonstrated in vitro: implications for atherogenesis*. Am J Pathol, 1996. **149**(1): p. 73-80.
54. Vora, D.K., Z.T. Fang, S.M. Liva, T.R. Tyner, F. Parhami, A.D. Watson, T.A. Drake, M.C. Territo, and J.A. Berliner, *Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression*. Circ Res, 1997. **80**(6): p. 810-8.
55. Tokito, A., M. Jougasaki, T. Ichiki, and S. Hamasaki, *Cardiotrophin-1 Induces Matrix Metalloproteinase-1 in Human Aortic Endothelial Cells*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68801.

56. Westein, E., A.D. van der Meer, M.J. Kuijpers, J.P. Frimat, A. van den Berg, and J.W. Heemskerk, *Atherosclerotic geometries exacerbate pathological thrombus formation poststenosis in a von Willebrand factor-dependent manner*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(4): p. 1357.
57. Halliwell, B. and J. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. 1998.
58. Mendez, J.I., W.J. Nicholson, and W.R. Taylor, *SOD isoforms and signaling in blood vessels: evidence for the importance of ROS compartmentalization*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(5): p. 887-8.
59. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein)*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
60. Petersen, S.V., T.D. Oury, L. Ostergaard, Z. Valnickova, J. Wegrzyn, I.B. Thogersen, C. Jacobsen, R.P. Bowler, C.L. Fattman, J.D. Crapo, and J.J. Enghild, *Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 13705-10.
61. Dhar, S.K., Y. Xu, and D.K. St Clair, *Nuclear factor kappaB- and specificity protein 1-dependent p53-mediated bi-directional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene*. J Biol Chem, 2010. **285**(13): p. 9835-46.
62. Liu, G., S.I. Feinstein, Y. Wang, C. Dodia, D. Fisher, K. Yu, Y.S. Ho, and A.B. Fisher, *Comparison of glutathione peroxidase 1 and peroxiredoxin 6 in protection against oxidative stress in the mouse lung*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(7): p. 1172-81.
63. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
64. Flohé, L., *A comparison of thiol peroxidase mechanisms*. Antioxid Redox Signal, 2011 **15**(3): p. 763-80.
65. Flohé, L., W.A. Günzler, and H.H. Schock, *Glutathione peroxidase: a selenoenzyme*. FEBS Lett, 1973. **32**(1): p. 132-4.
66. Lopez-Terradas, J.M., *[Introduction to the study of peroxisomal disorders]*. Rev Neurol, 1999. **28 Suppl 1**: p. S34-7.
67. Trujillo, M., G. Ferrer-Sueta, and R. Radi, *Kinetic studies on peroxynitrite reduction by peroxiredoxins*. Methods Enzymol, 2008. **441**: p. 173-96.
68. Kim, J.A., S. Park, K. Kim, S.G. Rhee, and S.W. Kang, *Activity assay of mammalian 2-cys peroxiredoxins using yeast thioredoxin reductase system*. Anal Biochem, 2005. **338**(2): p. 216-23.
69. Poole, L.B., *The catalytic mechanism of peroxiredoxins*. Subcell Biochem, 2007. **44**: p. 61-81.
70. Trujillo, M., H. Budde, M.D. Pineyro, M. Stehr, C. Robello, L. Flohe, and R. Radi, *Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34175-82.
71. Franco, R. and J.A. Cidlowski, *Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant*. Cell Death Differ, 2009. **16**(10): p. 1303-14.
72. Toledo, E., F.B. Hu, R. Estruch, P. Buil-Cosiales, D. Corella, J. Salas-Salvado, M.I. Covas, F. Aros, E. Gomez-Gracia, M. Fiol, J. Lapetra, L. Serra-Majem, X. Pinto, R.M. Lamuela-Raventos, G. Saez, M. Bullo, V.

- Ruiz-Gutierrez, E. Ros, J.V. Sorli, and M.A. Martinez-Gonzalez, *Effect of the Mediterranean diet on blood pressure in the PREDIMED trial: results from a randomized controlled trial*. BMC Med, 2013. **11**(1): p. 207.
73. Riso, P., C. Del Bo, S. Vendrame, A. Brusamolino, D. Martini, G. Bonacina, and M. Porrini, *Modulation of plasma antioxidant levels, glutathione S-transferase activity and DNA damage in smokers following a single portion of broccoli: a pilot study*. J Sci Food Agric, 2013.
74. Gorres, K.L. and R.T. Raines, *Prolyl 4-hydroxylase*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2010. **45**(2): p. 106-24.
75. Padayatty, S.J., A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J.H. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S.K. Dutta, and M. Levine, *Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention*. J Am Coll Nutr, 2003. **22**(1): p. 18-35.
76. de Gaetano, G., *Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. Collaborative Group of the Primary Prevention Project*. Lancet, 2001. **357**(9250): p. 89-95.
77. Salonen, J.T., K. Nyyssonen, R. Salonen, H.M. Lakka, J. Kaikkonen, E. Porkkala-Sarataho, S. Voutilainen, T.A. Lakka, T. Rissanen, L. Leskinen, T.P. Tuomainen, V.P. Valkonen, U. Ristonmaa, and H.E. Poulsen, *Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis*. J Intern Med, 2000. **248**(5): p. 377-86.
78. Rhinn, M. and P. Dollé, *Retinoic acid signalling during development*. Development, 2012. **139**(5): p. 843-58.
79. Noy, N., *Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis*. Annu Rev Nutr 2010. **30**: p. 201-17.
80. Feng, Y., Y.M. Yu, M.Z. Yin, L. Hong, and W. Cai, *Ectopic expression of retinoic acid receptors and change of myocardial structure in the offspring heart with vitamin A deficiency*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2012. **58**(5): p. 309-18.
81. Marin, C., J. Delgado-Lista, R. Ramirez, J. Carracedo, J. Caballero, P. Perez-Martinez, F.M. Gutierrez-Mariscal, A. Garcia-Rios, N. Delgado-Casado, C. Cruz-Teno, E.M. Yubero-Serrano, F. Tinahones, M. Malagon Mdel, F. Perez-Jimenez, and J. Lopez-Miranda, *Mediterranean diet reduces senescence-associated stress in endothelial cells*. Age (Dordr), 2012. **34**(6): p. 1309-16.
82. Shahidi, F. and P.K. Wanasundara, *Phenolic antioxidants*. Crit Rev Food Sci Nutr, 1992. **32**(1): p. 67-103.
83. Gaziano, J.M., R.J. Glynn, W.G. Christen, T. Kurth, C. Belanger, J. MacFadyen, V. Bubes, J.E. Manson, H.D. Sesso, and J.E. Buring, *Vitamins E and C in the prevention of prostate and total cancer in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial*. JAMA, 2009. **301**(1): p. 52-62.
84. Burgoyne, J.R., S. Oka, N. Ale-Agha, and P. Eaton, *Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(9): p. 1042-52.

85. Freeman, B.A., P.R. Baker, F.J. Schopfer, S.R. Woodcock, A. Napolitano, and M. d'Ischia, *Nitro-fatty acid formation and signaling*. J Biol Chem, 2008. **283**(23): p. 15515-9.
86. Kita, T., Y. Nagano, M. Yokode, K. Ishii, N. Kume, S. Narumiya, and C. Kawai, *Prevention of atherosclerotic progression in Watanabe rabbits by probucol*. Am J Cardiol, 1988. **62**(3): p. 13B-19B.
87. Parthasarathy, S., S.G. Young, J.L. Witztum, R.C. Pittman, and D. Steinberg, *Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein*. J Clin Invest, 1986. **77**(2): p. 641-4.
88. Inagaki, M., Y. Nakagawa-Toyama, M. Nishida, K. Nakatani, H. Nakaoka, M. Kawase, R. Kawase, K. Tsubakio-Yamamoto, D. Masuda, T. Ohama, A. Matsuyama, M. Ishigami, I. Komuro, and S. Yamashita, *Effect of probucol on antioxidant properties of HDL in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia*. J Atheroscler Thromb, 2012. **19**(7): p. 643-56.
89. Ishitobi, T., H. Hyogo, H. Tokumo, K. Arihiro, and K. Chayama, *Efficacy of probucol for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis with dyslipidemia: An open-label pilot study*. Hepatol Res, 2013.
90. Colle, D., D.B. Santos, E.L. Moreira, J.M. Hartwig, A.A. dos Santos, L.T. Zimmermann, M.A. Hort, and M. Farina, *Probucol increases striatal glutathione peroxidase activity and protects against 3-nitropropionic acid-induced pro-oxidative damage in rats*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67658.
91. Gorczynski, M.J., J. Huang, H. Lee, and S.B. King, *Evaluation of nitroalkenes as nitric oxide donors*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. **17**(7): p. 2013-7.
92. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
93. Lang, B.S., A.C. Gorren, G. Oberdorfer, M.V. Wenzl, C.M. Furdui, L.B. Poole, B. Mayer, and K. Gruber, *Vascular bioactivation of nitroglycerin by aldehyde dehydrogenase-2: reaction intermediates revealed by crystallography and mass spectrometry*. J Biol Chem, 2012. **287**(45): p. 38124-34.
94. Salloum, F.N., A. Das, A. Samidurai, N.N. Hoke, V.Q. Chau, R.A. Ockaili, J.P. Stasch, and R.C. Kukreja, *Cinaciguat, a novel activator of soluble guanylate cyclase, protects against ischemia/reperfusion injury: role of hydrogen sulfide*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(6): p. H1347-54.
95. Sharina, I., M. Sobolevsky, M.F. Doursout, D. Gryko, and E. Martin, *Cobinamides are novel coactivators of nitric oxide receptor that target soluble guanylyl cyclase catalytic domain*. J Pharmacol Exp Ther, 2012. **340**(3): p. 723-32.
96. Trostchansky, A., L. Bonilla, L. Gonzalez-Perilli, and H. Rubbo, *Nitro-Fatty acids: formation, redox signaling, and therapeutic potential*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(11): p. 1257-65.
97. Coles, B., A. Bloodsworth, S.R. Clark, M.J. Lewis, A.R. Cross, B.A. Freeman, and V.B. O'Donnell, *Nitrolinoleate inhibits superoxide generation, degranulation, and integrin expression by human neutrophils: novel antiinflammatory properties of nitric oxide-derived reactive species in vascular cells*. Circ Res, 2002. **91**(5): p. 375-81.

98. Schopfer, F.J., Y. Lin, P.R. Baker, T. Cui, M. Garcia-Barrio, J. Zhang, K. Chen, Y.E. Chen, and B.A. Freeman, *Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(7): p. 2340-5.
99. Baker, P.R., Y. Lin, F.J. Schopfer, S.R. Woodcock, A.L. Groeger, C. Batthyany, S. Sweeney, M.H. Long, K.E. Iles, L.M. Baker, B.P. Branchaud, Y.E. Chen, and B.A. Freeman, *Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands*. J Biol Chem, 2005. **280**(51): p. 42464-75.
100. Schopfer, F.J., P.R. Baker, G. Giles, P. Chumley, C. Batthyany, J. Crawford, R.P. Patel, N. Hogg, B.P. Branchaud, J.R. Lancaster, Jr., and B.A. Freeman, *Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 19289-97.
101. Blanco, F., A.M. Ferreira, G.V. Lopez, L. Bonilla, M. Gonzalez, H. Cerecetto, A. Trostchansky, and H. Rubbo, *6-Methylnitroarachidonate: a novel esterified nitroalkene that potently inhibits platelet aggregation and exerts cGMP-mediated vascular relaxation*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(3): p. 411-8.
102. Trostchansky, A., J.M. Souza, A. Ferreira, M. Ferrari, F. Blanco, M. Trujillo, D. Castro, H. Cerecetto, P.R. Baker, V.B. O'Donnell, and H. Rubbo, *Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate*. Biochemistry, 2007. **46**(15): p. 4645-53.
103. Wright, M.M., F.J. Schopfer, P.R. Baker, V. Vidyasagar, P. Powell, P. Chumley, K.E. Iles, B.A. Freeman, and A. Agarwal, *Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid potently activates endothelial heme oxygenase 1 expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4299-304.
104. Cui, T., F.J. Schopfer, J. Zhang, K. Chen, T. Ichikawa, P.R. Baker, C. Batthyany, B.K. Chacko, X. Feng, R.P. Patel, A. Agarwal, B.A. Freeman, and Y.E. Chen, *Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators*. J Biol Chem, 2006. **281**(47): p. 35686-98.
105. Ferreira, A.M., M.I. Ferrari, A. Trostchansky, C. Batthyany, J.M. Souza, M.N. Alvarez, G.V. Lopez, P.R. Baker, F.J. Schopfer, V. O'Donnell, B.A. Freeman, and H. Rubbo, *Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 223-34.
106. Villacorta, L., J. Zhang, M.T. Garcia-Barrio, X.L. Chen, B.A. Freeman, Y.E. Chen, and T. Cui, *Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H770-6.
107. Rudolph, V., T.K. Rudolph, F.J. Schopfer, G. Bonacci, S.R. Woodcock, M.P. Cole, P.R. Baker, R. Ramani, and B.A. Freeman, *Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion*. Cardiovasc Res, 2010. **85**(1): p. 155-66.
108. Zhang, J., L. Villacorta, L. Chang, Z. Fan, M. Hamblin, T. Zhu, C.S. Chen, M.P. Cole, F.J. Schopfer, C.X. Deng, M.T. Garcia-Barrio, Y.H.

- Feng, B.A. Freeman, and Y.E. Chen, *Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension*. *Circ Res*, 2010. **107**(4): p. 540-8.
109. Celano, L., *Tesis Doctoral: Nitroalquenos aromáticos como antioxidantes y fármacos potenciales en artritis reumatoidea*. 2013, Universidad de la República. p. 114.
110. Frache, R., *Tesina de Grado: Diseño, síntesis y evaluación biológica de nitroalquenos y nitroalcanos como potenciales agentes antioxidantes*. 2010.
111. Brown, B.R., *Nitroalkenes and nitroalkynes*, in *The Organic Chemistry of Aliphatic Nitrogen Compounds*, O.S. Publications, Editor. 1994, Oxford University Press: United States. p. 470-1.
112. Mock, G.A. and J.G. Moffatt, *An approach to the total synthesis of sinefungin*. *Nucleic Acids Res*, 1982. **10**(20): p. 6223-34.
113. Seoane G., O.S., Risso M., Umpiérrez E., *Tablas espectroscópicas para elucidación estructural*. 2006, Facultad de Química: UdelaR.
114. Werber, J., Y.J. Wang, M. Milligan, X. Li, and J.A. Ji, *Analysis of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride degradation and hydrolysis in aqueous solutions*. *J Pharm Sci*, 2011. **100**(8): p. 3307-15.
115. Dejian Huang, B.O., *High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format*. *J. Agric. Food Chem.*, 2002. **50**: p. 4437-4444.
116. Dejian Huang, B.O., *Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated β -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer*. *J. Agric. Food Chem.*, 2002. **50**: p. 1815-1821.
117. Chung, B.H., J.P. Segrest, M.J. Ray, J.D. Brunzell, J.E. Hokanson, R.M. Krauss, K. Beaudrie, and J.T. Cone, *Single vertical spin density gradient ultracentrifugation*. *Methods Enzymol*, 1986. **128**: p. 181-209.
118. Londero, D. and P. Lo Greco, *Automated high-performance liquid chromatographic separation with spectrofluorometric detection of a malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in plasma*. *J Chromatogr A*, 1996. **729**(1-2): p. 207-10.
119. Stocker, R., V.W. Bowry, and B. Frei, *Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(5): p. 1646-50.