



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Determinació de l'activitat antioxidant de composts anàlegs a la 3-hidroxi piridina.

Cristina Llompарт Mariano

Grau de química

Any acadèmic 2015-16

DNI de l'alumne: 78220523F

Treball tutelat per Bartomeu Vilanova Canet
Departament de Química

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Radicals lliures, activitat antioxidant, 3-hidroxi piridina, vitàmers B₆

Índex

Resum	4
1. Introducció i antecedents	5
1.1. Radicals lliures	5
1.2. Procés de glicació de biomolècules	6
1.2.1. Mecanisme de la glicació	7
1.2.2. Espècies reactives: ROS i RCS. Estrès oxidatiu	8
1.3. Inhibidors de radicals	9
1.3.1. Vitàmers B ₆	9
1.4. Mètodes per a determinar la capacitat antioxidant	11
2. Objectiu	13
3. Metodologia	13
3.1. Materials/Reactius	13
3.2. Tècniques experimentals	13
3.2.1. Espectroscòpia UV-Visible	13
3.2.2. pH-metre	13
3.3. Programari informàtic	14
3.3.1. Sigmaplot	14
3.3.2. Chemoffice	14
3.4. Mètodes per a determinar l'activitat antioxidant	14
3.4.1. Activitat segrestadora del radical hidroxil (Mètode CUPRAC)	14
3.4.1.1. Preparació de dissolucions	16
3.4.1.2. Assaig	16
3.4.2. Activitat segrestadora del radical DPPH	16
3.4.2.1. Preparació de dissolucions	17
3.4.2.2. Assaig modificat	17
3.4.3. Activitat segrestadora del radical anió superòxid	17
3.4.3.1. Preparació de dissolucions	18
3.4.3.2. Assaig	18
4. Resultats i discussions	18
4.1. Espectres UV-Visible dels composts antioxidants	18
4.2. Activitat segrestadora del radical hidroxil (mètode CUPRAC)	19
4.3. Activitat segrestadora del radical DPPH	21
4.3.1. Espectre UV-Visible del DPPH	21
4.3.2. Estabilitat del DPPH	22
4.3.3. Capacitat antioxidant	22
4.4. Activitat segrestadora del radical anió superòxid	25
4.4.1. Capacitat antioxidant	25
5. Conclusions	28
6. Abreviacions	29
7. Bibliografia	30

Resum

Els radicals lliures (RL) són totes aquelles espècies químiques, carregades o no, que en la seva estructura atòmica presenten un electró desaparellat, donant-li una gran inestabilitat. El fet de posseir una estructura radicalària fa que siguin molt reactius i que actuïn prop del lloc on són formats.

La majoria dels RL que es produeixen al nostre sistema biològic són els radicals lliure d'oxigen, entre els quals podem destacar: $\cdot O_2^-$ (radical anió superòxid), $\cdot OH$ (radical hidroxil), $ROO\cdot$ (radical peròxid) i la presència de H_2O_2 (peròxid d'hidrogen). Però també tenen importància els radicals lliures de nitrogen, entre els quals es pot destacar: $NO\cdot$ (radical òxid de nitrogen), $NO_2\cdot$ (radical diòxid de nitrogen), $ONOO^-$ (peroxinitrit), i ClO^- (anió hipoclorit) entre d'altres [Kuyvenhoven, 1999].

Tot i la importància dels RL en certes reaccions biològiques, un excés d'aquests provoca un desequilibri no compensat pels antioxidants presents en el cos, i com a conseqüència, l'aparició de d'anys cel·lulars que tenen una repercussió molt important sobre l'activitat funcional biològica;

La Diabetis Mellitus (DM) es tracta d'un desordre metabòlic que provoca un augment dels nivells de glucosa en sang (hiperglucèmia). Diversos estudis suggereixen que la hiperglucèmia augmenta la producció de radicals lliures d'oxigen a l'organisme que poden accelerar les conseqüències patològiques associades a la DM. Per aquest motiu, la inhibició de la producció de radicals lliures o la seva eliminació adquireix una gran importància en el tractament de la DM.

En aquest treball, s'ha determinat la capacitat antioxidant de compostos anàlegs a la 3-hidroxi-piridina com són la piridoxina (PN), la piridoxamina (PM), el 5'-fosfat de piridoxal (PLP), la 3-hidroxi-2-metilpiridina(3H2MP) i la 2-cloro-3-hidroxipiridina(2Cl3HP). La elecció d'aquests compostos es deu a que es va demostrar la importància de la PM com a compost antioxidant a individus diabètics a causa de la seva gran capacitat de captar radicals lliures presents en l'organisme [Voziyan, 2005].

La gran varietat de RL en l'organisme dona lloc a l'aparició d'un nombre elevat de diferents mètodes experimentals per a determinar la capacitat antioxidant de certs compostos [Alam, 2013]. En aquest treball, s'ha determinat l'activitat antioxidant dels compostos indicats al paràgraf anterior en front dels radicals DPPH, $\cdot OH$ i $\cdot O_2^-$, essent aquests dos últims produïts en l'organisme. Els resultats obtinguts confirmen que tant la piridoxamina com el 5'-fosfat de piridoxal són els compostos amb major capacitat antioxidant dels estudiats en aquest treball. La capacitat antioxidant d'aquest compostos en front del radical DPPH es deu a la gran tendència que tenen d'alliberar el protó del grup fenol present en 3; mentre que en front del radical $\cdot O_2^-$, la PM presenta la major capacitat antioxidant que es pot deure a la seva capacitat de formar complexos.

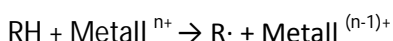
1. Introducció i antecedents

1.1 Radicals lliures

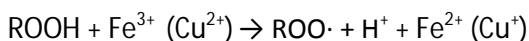
Els radicals lliures, com ja he dit, es tracten de molècules que presenten un electró desaparellat en un orbital extern, donant-li una alta inestabilitat. La majoria dels RL que es produeixen al nostre sistema són els d'oxigen i els de nitrogen, podent-se produir radicals lliures dintre (endògens) i fora (exògens) de l'organisme a través de diversos processos químics [Rodríguez, 2001].

Les principals fonts endògenes d'espècies oxidants i radicals lliures en l'organisme són produïdes durant la respiració mitocondrial. En la formació d'ATP a través del metabolisme oxidatiu i transport electrònic mitocondrial, l'O₂ es redueix fins H₂O seguint la via tetravalent. Així, l'O₂ es redueix en quatre etapes, on en cada una es produeix una transferència d'un electró. Però el transport electrònic mitocondrial és imperfecte i la reducció monoelectrònica d'oxigen genera el radical ·O₂⁻. La disminució espontània i enzimàtica del ·O₂⁻ dona lloc a la formació de H₂O₂, i per tant, el ·O₂⁻ com el H₂O₂ poden generar radicals ·OH a través de reaccions de Fenton catalitzades per metalls de transició. D'aquesta manera, s'estima que en condicions fisiològiques normals entre un 1 i el 3% de l'oxigen consumit per l'organisme no arriba a formar aigua i acaba generant radicals lliures i espècies reactives d'oxigen (ROS) [Aldini, 2013]

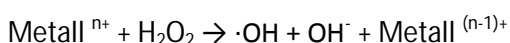
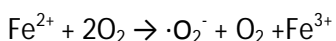
A més a més, els RL també són produïts per reaccions en cadena de peroxidació lipídica. Els RL i altres espècies reactives són capaços d'extreure un àtom d'hidrogen d'un àcid gras saturat generant un radical lipídic (R·), el qual pot reaccionar amb O₂ donant lloc a un radical peròxid (ROO·). Aquests radicals peròxid contribueixen a la propagació de reaccions en cadena de peroxidació lipídica extraient àtoms d'hidrogen d'altres àcids grassos insaturats pròxims, generant així nous radicals lipídics (R·) i hidroperòxids lipídics (ROOH). Aquests darrers es descomponen en radicals alcòxid (RO·) i peròxid (ROO·) contribuint a la propagació de danys oxidatius. Aquesta descomposició es veu facilitada per l'exposició a la llum UV o per la presència de ions metàl·lics, a través de reaccions de Fenton. Així, metalls de transició com són el ferro i el coure són capaços d'accelerar la inhibició i propagació del procés de peroxidació lipídica mitjançant el següent mecanisme:



Els metalls poden descompondre els hidroperòxids lipídics generant radicals peròxid i alcòxid, accelerant les reaccions en cadena [Kehrer, 2000].



D'altra banda, els metalls implicats en la generació d'oxigen singlet poden reaccionar amb el peròxid d'hidrogen per a generar radicals hidroxil [Kehrer, 2000].



Existeixen, per altre part, estímuls exògens que incrementen la generació d'espècies oxidants. Entre ells hi ha la radiació ultraviolada, contaminants ambientals, l'activitat física intensa, la

metal·lització de fàrmacs, el fum del tabac, l'acció de cèl·lules immunològic o dietes deficientes en antioxidants [Aldini, 2013].

L'elevada generació d'espècies reactives i de radicals lliures en el cos humà fa que existeixin mecanismes de defensa antioxidant, integrats per sistemes enzimàtics i no enzimàtics, entre els quals podem destacar els descrits a la taula 1.1.

Taula 1.1 Antioxidants i la seva funció [Rodríguez, 2001], [Venereo, 2002].

Sistema	Funció
Enzims	
Superòxid dismutasa	Eliminació de radicals superòxid
Catalasa	Eliminació d'hidroperòxids
Glutatió peroxidasa (GPx)	Eliminació d'hidroperòxids
Glutatió reductasa (GRed)	Reducció de glutatió oxidada
Glutatió-s-transferasa (GST)	Eliminació de peròxids lipídics
Metionina sulfòxid reductasa	Reparació de residus oxidats de metionina
peroxidasa	Descomposició de peròxid d'hidrogen i peròxids lipídics
Antioxidants del plasma/sèrum	
Àcid úric	Captador d'oxigen singlet i radicals lliures
Albúmina	Activitat peroxidasa en presència de GSH
Bilirubina	Captació de radicals peròxid
Glutatió reduït (GSH)	Substrat per l'acció dels enzims GPx i GST i captador de radicals lliures
Ubiquinol (coenzim Q)	Captador de radicals lliures
Antioxidants de la dieta	
Àcid ascòrbic	Reacció amb superòxids, oxigen singlet i radicals peròxid. Regeneració de tocoferols
Tocoferols	Protecció de membranes lipídiques. Bloqueig de la cadena de reaccions de peroxidació
Carotenoides	Desactivació de l'oxigen singlet. Bloqueig de la cadena de reaccions de peroxidació
Composts fenòlics	Captació de radicals lliures i activitats quelants de metalls

En el següent apartat s'explicarà detalladament el procés de glicació de biomolècules el qual accelera l'aparició dels radicals lliures en persones diabètiques i/o en condicions d'hiperglucèmia.

1.2 Procés de glicació de biomolècules

La glicació coneguda anteriorment com a glucosilació no enzimàtica de proteïnes fou estudiada des de principis del segle vint per Maillard, a partir de la seva aplicació en la indústria alimentària per a la millora de l'aspecte i el sabor dels aliments [Chobert, 2006]. La seva rellevància aparegué a partir del descobriment de molècules d'hemoglobina glucosilades en la sang d'individus sans i l'augment d'aquesta en persones que patien diabetis [Koenig, 1976]. Per aquesta raó, es considera a la glicació una de les principals causes de modificació química espontània de proteïnes cel·lulars i extracel·lulars en els sistemes fisiològics.

1.2.1 Mecanisme de la glicació

La glicació es tracta d'una reacció (irreversible, no enzimàtica) del grup amina present en les cadenes laterals de les proteïnes amb el grup carbonil dels sucres reductors. Al llarg d'aquesta reacció podem distingir clarament tres etapes, veure figura 1.2:

- Formació d'una Base de Schiff (BS): la reacció s'inicia mitjançant la condensació del sucre reductor amb el grup amina de la proteïna.
- Producte d'Amadori (PA): la BS pateix una sèrie de reordenaments a fi de que l'estructura presenti la forma més estable. La BS i el PA es denominen en conjunt com a productes de glicació primerenca; on es presentaran alts nivells d'aquests quan la glucosa en sang sigui elevada i baix nivells d'aquests quan el nivell de glucosa en sang es baix [González, 2000].
- Productes finals de la glicació: el PA experimenta una sèrie de transformacions químiques que dona lloc a composts colorats i/o fluorescents que reben el nom de productes finals de la glicació avançada (AGEs). L'aparició dels AGEs ve determinada per la concentració de sucres reductors i el temps d'exposició a la proteïna; és a dir, depèn de la vida mitjana de la proteïna. Per aquesta raó, aquesta darrera etapa sols tindrà lloc en proteïnes que presentin una vida mitja considerablement llarga, ja que les proteïnes de recanvi ràpid no solen superar les dues etapes anteriors.

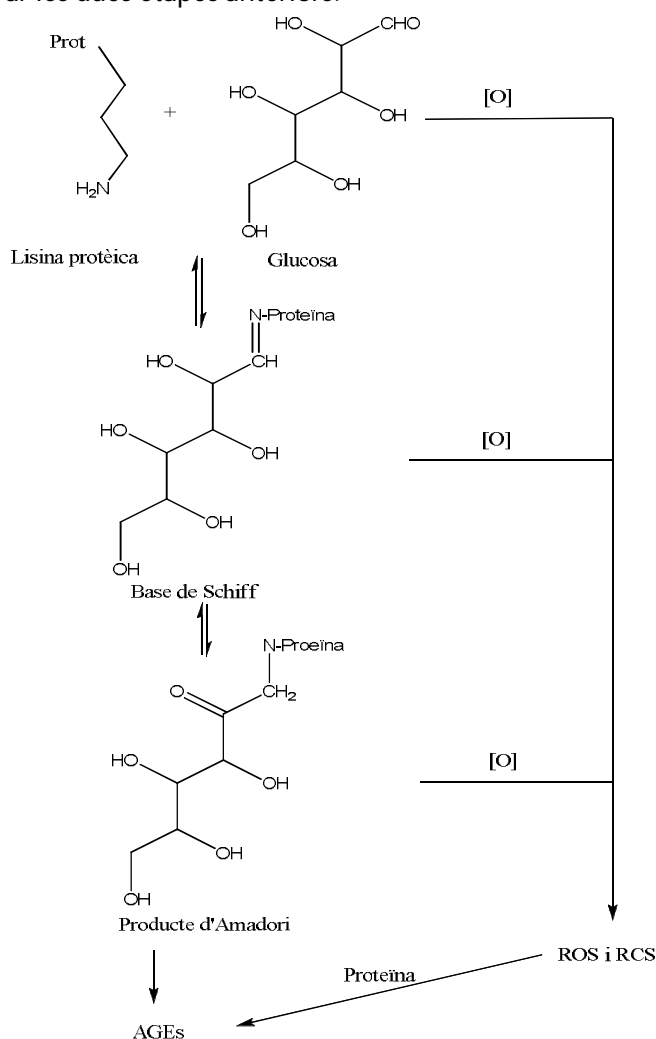


Figura 1.2. Mecanisme general de la glicació.

Existeixen reaccions colaterals d'oxidació de la glucosa, la BS i els PA que donen lloc a la formació de productes altament reactius com són espècies d'oxigen reactives (ROS) i espècies carboníliques reactives (RCS).

1.2.2. Espècies reactives: ROS i RCS. Estrès oxidatiu

La possibilitat de sofrir patologies a causa del procés de glicació es deu a l'aparició d'espècies reactives, entre les quals es pot destacar: ROS i RCS. Tant els ROS com els RCS causen d'anys cel·lulars degut a les reaccions directes que es poden dur a terme amb l'ADN, proteïnes i lípids.

Les RCS són petites molècules carboníliques activades per α,β -insaturacions com la 4-hidroxinonena i l'acroleïna. A més a més, són un subproducte del metabolisme cel·lular, inclòs la formació de metilgloxal durant la glucòlisis i nombroses reaccions espontànies incloent la glicació, autooxidació de sucres, la peroxidació de lípids i el dany produït per la radiació solar. La glicació és una font important de RCS tals com gloxal, metilgloxal i 3-deoxiosones generats per oxidació (glicació) i reaccions no-oxidatives. Aquest intermediari reaccionen addicionalment per a formar AGEs, veure figura 1.2.

Com s'ha indicat prèviament, les ROS inclouen radicals lliures com $\cdot O_2^-$ (anió superòxid), $\cdot O_2$ (radical oxigen), $\cdot ONOO$ (peroxi nitrit), $\cdot OH$ (hidroxil), i no-radicals com H_2O_2 (peròxid d'hidrogen) i O_2^- (anió superòxid). Es produeixen per cèl·lules aeròbiques, durant l'incomplet procés de reducció d'oxigen en la respiració, i donant lloc a ser el protagonista de l'estrès oxidatiu [Matxain, 2009], entès com a l'alteració de l'equilibri entre la producció d'espècies reactives d'oxigen (radicals lliures) i les defenses antioxidants, els quals poden danyar el teixit.

Les ROS i els RCS es tracten de molècules molt reactives les quals poden actuar sobre les cadenes laterals de molts aminoàcids donant lloc a la formació de AGEs. En canvi, la glucosa reacciona essencialment amb el grup N-terminal de la proteïna.

Existeixen diferents productes de degradació de la glucosa a partir de les reaccions oxidatives que poden generar ROS. Hunt i col. determinaren al 1988 que la glucosa donava lloc al compost carbonílic desoxiglucosa (1-DG) i a algunes espècies reactives d'oxigen, com el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i el radical hidroxil ($\cdot OH$) [Hunt, 1988]; mentre que al 1999, Thornalley i col. determinaren que per diverses vies, la glucosa també podia produir els composts carbonílics gloxal (GO), metilgloxal (MGO) i glicolaldehid (GLA) en condicions fisiològiques. A més a més, la reoxidació del GLA produeix novament GO i ROS com H_2O_2 i $\cdot OH$ [Thornalley, 1999].

Per altre part, Mullarkey i col. varen comprovar la producció del radical anió superòxid ($\cdot O_2^-$) a partir de la degradació oxidativa de la BS [Mullarkey, 1990]. De manera similar, Mossine i col. demostraren que la degradació dels PA també pot generar el radical anió superòxid ($\cdot O_2^-$) [Mossine, 1999].

Apart de l'obtenció de radicals a través de la glicació proteica, els productes finals de la glicació avançada poden donar lloc a una major producció de ROS mitjançant el procés d'unió a molècules acceptores específiques, coneixent-se com a receptors de AGEs (RAGEs).

1.3 Inhibidors de radicals lliures.

Els AGEs i l'estrès oxidatiu han estat associats a una ampla varietat de patologies relacionades amb la hiperglucèmia, i han provocat un augment en l'estudi de inhibidors del procés de glicació que puguin suprimir la formació dels AGEs o segrestar els reactius dicarbonílics. Entre ells, ens cal destacar: l'aminoguanidina, la metaformina, la carnosina, la homocarnosina, la piridoxamina, OPB-9195 i PTB [Wautier, 2004].

S'ha comprovat que els inhibidors del procés de glicació poden actuar a través d'algun dels següents mecanismes:

- Quelació dels metalls que catalitzen el pas de BS-PA
- Reacció amb les ROS
- Reacció amb les RCS
- Bloquejadors dels RAGEs

Per a poder minimitzar la producció de AGEs, el cos ha desenvolupat un nombre de mecanismes de defensa enzimàtica i no enzimàtica, on podem destacar el sistema glicoxalasa, el qual està compost pels enzims glicoxalasa-I (GLO1) i glicoxalasa-II(GLO2), i que està considerat com un dels mecanismes més importants que ens protegeix dels AGEs. Aquest sistema és responsable de la desintoxicació del reactiu dicarbonílic MGO i, en menor mesura, del glicoxal. El GLO1 es considera l'enzim clau en la defensa d'antiglicació. Recentment, s'ha pogut observar en rates diabètiques una reducció dels nivells d'estrès oxidatiu, reducció de la concentració de MGO i glicoxal; així com un menor deterior per hiperglucèmia [Fleming, 2011].

En aquest treball, em centraré amb la 3-hidroxi-2-metilpiridina i derivats seus, concretament del vitàmer B₆, així com de la 3-hidroxi-2-metilpiridina(3H2MP) i 2-cloro-3hidroxi-2-metilpiridina(2Cl3HP); i addicionalment s'ha estudiat l'activitat antioxidant de l'àcid L-ascòrbic pel mètode del DPPH.

1.3.1 Vitàmers B₆

La vitamina B₆, també coneguda com a piridoxina (PN), fou descoberta al 1934 per György. Posteriorment, es descobriren anàlegs d'aquesta: la piridoxamina (PM), i el piridoxal (PL); a més, la PN és el precursor dels derivats actius biològics 5'-fosfat-piridoxina (PNP), 5'-fosfat-piridoxal (PLP) i 5'-fosfat-piridoxamina (PMP), coneguts conjuntament com a vitàmers B₆ els quals actuen com a cofactors d'enzims implicats en el metabolisme d'aminoàcids.

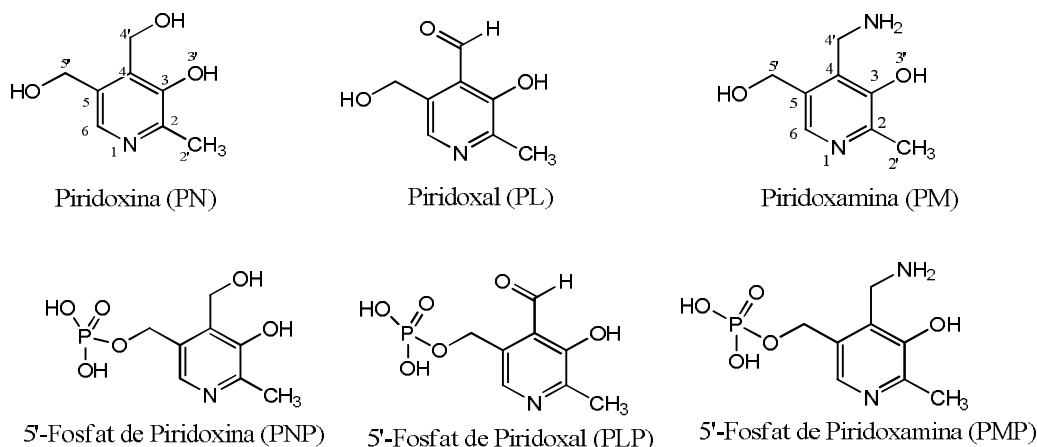


Figura 1.3. Estructura dels vitàmers B₆

Aquest grup de vitàmers ajuda al metabolisme de proteïnes, greixos i carbohidrats. Complexos de vitamina B presenten un paper important de manteniment del to muscular en el tracte gastrointestinal, promoció de la salut del sistema nerviós, la pell, en el pel, als ulls, la boca i el fetge.

Al 1988, Khatami i col. van demostrar per primera vegada la capacitat dels vitàmers B₆ de inhibir la glicació proteica. La PN ha demostrat presentar eficaces propietats com a antioxidant. La deficiència biosintètica de PN als fongs i al llevat ha demostrat ser sensibles a ROS, tals com al singlet oxigen i al peròxid d'hidrogen [Matxain, 2006]. Aquest fet suggereix que la vitamina B₆ i els seus derivats, estan implicats en la tolerància de l'estrès oxidatiu. Per altre part, la PM actua com inhibidor en la glicació i en el procés de lipoxidació; i recentment, s'ha demostrat que pot actuar com a segrestadora d'espècies CO produïdes en la degradació de sucre i lípids; inhibint l'oxidació dels PA mitjançant reaccions catalitzades per metalls; i segrestadors d'espècies radicalàries mitjançant l'alliberació d'un protó del grup OH del C(3) [Vilanova, 2011; Voziyan, 2002; Price, 2001].

S'han fet estudis sobre el mecanisme de reacció de la PN amb els radicals ·OH, ·OOH i ·O₂; i s'ha vist que endemés de la importància del protó fenòlic, s'ha suggerit la possibilitat de participació de l'H del C(4') o C(5') amb el radical hidroxil (veure numeració a la figura 1.3). A més a més, existeixen altres mecanismes que impliquen l'H del OH-C(4') i OH-C(5'), encara que aquesta reacció és considera menys exergònica [Matxain, 2009]

També es va demostrar que el PL i el PLP eren capaços de inhibir la glicació de proteïnes mitjançant la formació d'una base protectora amb grups amina de proteïnes i de amin fosfolípids. Aquesta reactivitat, juntament amb la seva capacitat de neutralitzar els radicals lliures, els hi dona certes propietats inhibidores del desenvolupament patològic associats a la DM. Però el millor vitàmer B₆ inhibidor de la glicació proteica es la PM, ja que es capaç de inhibir el desenvolupament de patologies neuronals, retinals i renals associades a la DM [Stitt, 2005], [Waanders, 2005]; i, a més a més, és capaç de disminuir la dislipèmia diabètica induïda per la hiperglucèmia i els RL; ja que la seva manera d'actuar és inhibint la formació de AGEs en el procés de glicació ja sigui inhibint la formació de radicals com és el cas del radical hidroxil a partir de la reacció de Fenton o a través de la reacció directa amb el radical.

Halliwell i Gutteridge foren els primers autors en proposar que la PM reacciona amb el radical hidroxil, ·OH, de forma directa. Posteriorment, es feren estudis amb un anàleg a l'estructura de la PM, la 3-hidroxipiridina (3HP), la qual presenta una eficiència similar per eliminar el radical hidroxil a través del mètode CUPRAC, que va dur a molts autors a concloure que l'hidroxil fenòlic és suficient per inhibir a través de la donació de l'àtom d'hidrogen [Galdez, 2010]; tot i que més endavant es va suggerir la possibilitat de la hidroxilació de l'anell piridínic [Voziyan, 2005].

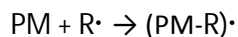
S'han proposat tres possibles mecanismes de reacció entra la PM i els radicals lliures [Galano,2011]:

HAT: transferència de l'àtom d'hidrogen. Correspon a l'absorció d'un àtom d'hidrogen, ·H, per part del radical, deixant la molècula PM en forma radicalària, PM·, i neutralitzant el radical lliure inicial. De manera general es pot descriure com:



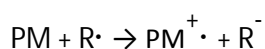
S'ha considerat la possibilitat que aquest mecanisme es dugui a terme en les posicions H-C(6), H₃C-C(2'), H₂C-C(4'), H₂C-C(5'), HO-C(3), HO-C(5') i NH₂-C(4') de la PM, veure figura 1.3.

RAF: Formació d'adductes radicalaris. El radical s'enllaça a un àtom de la molècula PM formant un complex. De manera general es pot descriure com:



S'ha considerat la possibilitat que aquest mecanisme es dugui a terme a qualsevol àtom de l'anell aromàtic, N(1), C(2), C(3), C(4), C(5) i C(6) de la PM, veure figura 1.3.

SET: Transferència d'un electró simple. Consisteix en la transferència d'un electró de la molècula de PM al radical lliure, quedant aquest últim com un anió o la molècula en forma radicalària i catiònica. De manera general, es pot descriure com:



No es poden determinar les posicions concretes en que es du a terme aquest mecanisme, ja que no es possible localitzar de forma precisa l'àtom del qual s'extreu l'electró.

1.4 Mètodes per a determinar la capacitat antioxidant

Per a determinar la capacitat antioxidant d'un compost existeixen diferents mètodes, entre els quals hem de destacar dos grans grups: els mètodes *in vitro* i els mètodes *in vivo*. Com es d'esperar, em centraré en els mètodes *in vitro*.

A un estudi recent [Alam, 2013] els mètodes per a determinar la capacitat antioxidant s'han classificat en vint grups. He decidit agrupar-los per famílies de radicals. A continuació es pot veure la meua classificació:

- 1) Activitat captadora del radical DPPH. Es tracta d'un radical molt estable i el mètode consisteix en diluir el compost antioxidant en metanol i mesclar-ho amb el DPPH. Després de 30 minuts d'incubació, es llegeix l'absorbància de la mescla a 517 nm.
- 2) Activitat captadora del peròxid d'hidrogen (H₂O₂). Consisteix en la determinació de peròxid d'hidrogen mitjançant la lectura d'absorbància a 230 nm al mesclar una dissolució de la mostra amb peròxid d'hidrogen.
- 3) Activitat captadora de l'òxid nítric. El compost nitroprussiat de sodi és conegut per descompondre's en solució aquosa a pH 7,2 produint NO[•]; on sota condicions aeròbiques, el NO[•] reacciona amb l'oxigen per produir productes estables (nitrat i nitrit), les quantitats dels quals poden ser determinats utilitzant el reactiu de Griess.
- 4) Activitat captadora del radical peroxinitrit. Consisteix en determinar la presència de ONOO[•] a partir de l'oxidació de la dihidroxirodamina (DHR), llegint en un espectrofotòmetre de fluorescència de microplaques a una longitud d'ona d'excitació de 485 nm i una d'emissió a 530 nm.
- 5) Mètode per a determinar la capacitat antioxidant equivalent Trolox (TEAC). Consisteix en la utilització d'un espectrofotòmetre de díode per a mesurar la pèrdua de color quan s'afegeix un antioxidant al cromòfor ABTS^{•+} que presenta coloració a 734 nm.

- 6) Mètode per a determinar la capacitat antioxidant total (TRAP). Aquest mètode es basa en la disminució de la fluorescència de la R-ficoeritrina (R-PE) durant la reacció controlada de peroxidació.
- 7) Assaig per a determinar el poder antioxidant fèrric (FRAP). Consisteix en la reducció a pH àcid de l'ió fèrric a l'ió ferrós, donant lloc a la formació del complex tripiridiltriazin-ferrós, el qual es determina la seva absorbància a 593 nm.
- 8) Activitat captadora de radicals superòxid (SOD). Es basa en la reducció de Nitro Blue Tetrazol (NBT) en presència de NADH i Fenazina Meta Sulfonat (PMS) sota condicions aeròbiques.
- 9) Activitat captadora de radicals hidroxil. Consisteix en la formació de $\cdot\text{OH}$ a partir de la reacció de Fenton. El $\cdot\text{OH}$ reacciona amb el salicilat, donant lloc a la formació hidroxilada del salicilat i posteriorment es llegeix l'absorbància a 530 nm. Existeixen possibles variants com són: el mètode HORAC i el mètode CUPRAC.
- 10) Capacitat captadora del radical oxigen (ORAC). Es basa en la generació de radicals lliures utilitzant AAPH (2,2-azobis dihidroclorur de 2-amidopropà) i la mesura de la disminució de la fluorescència en presència d'antioxidants, essent la longitud d'ona d'excitació i emissió de 485 nm i 520 nm, respectivament.
- 11) Mètode del poder reductor (RP). En aquest mètode, el compost antioxidant forma un complex amb ferricianur de potassi, àcid acètic triclorat i clorur fèrric, que es mesura a 700 nm.
- 12) Mètode del fosfomolibdè. Es basa en la reducció de Mo (VI) a Mo (V) per l'anàlisi de la mostra i la formació posterior d'un complex verd de fosfat de Mo (V) a pH àcid. Es determina la seva absorbància a 695 nm.
- 13) Mètode del DMPD (N,N-dimetil-p-fenilè diamina). Es basa en la reducció d'una solució de DMPD en tampó acetat i clorur fèrric. Es llegeix la disminució de l'absorbància del DMPD en presència d'antioxidants a 505 nm.
- 14) Mètode de l'àcid lineic β -carotè. Es basa en que l'àcid linoleic s'oxida en presència de ROS produïts pel peròxid d'hidrogen. Els productes formats inicien l'oxidació del β -carotè, conduint a una decoloració. Es mesura a 434 nm la disminució de l'absorbància en presència d'antioxidants.
- 15) Activitat quelant de metalls. La ferrozina pot formar un complex de color vermell mitjançant quelants de Fe^{2+} . Aquesta reacció està restringida per la presència d'altres agents quelants i resulten una disminució del color vermell del complex ferrozina- Fe^{2+} a l'addicionar un antioxidant. Es mesura la reducció de la coloració a 562 nm.

En aquest treball, em centraré en tres mètodes: mètode del DPPH, mètode segrestador del radical hidroxil (CUPRAC) i mètode del radical aniónic superòxid. L'elecció d'aquests mètodes i no uns altres de la llarga llista exposada anteriorment es deu a que aquests mètodes fan ús d'un material bàsic de laboratori com és l'espectrofotòmetre UV-Visible, el qual tenim a disposició en la Universitat. A més, les temperatures d'operació no són gaires elevades, evitant possibles degradacions dels composts; i finalment, es fa ús de reactius que no necessiten gaires restriccions a l'hora de ser manipulats. La limitació de temps no m'ha permès estudiar més mètodes.

2. Objectiu

Mitjançant la realització d'aquest treball de fi de grau, es pretén aconseguir els següents objectius globals:

- Analitzar la viabilitat de determinats mètodes analítics per a determinar la capacitat antioxidant de derivats de la 3HP. Per a poder dur a terme aquest objectiu global em centraré en els mètodes segrestadors de radicals hidroxil, del radical DPPH i del radical aniònic superòxid.
- Estudiar la capacitat antioxidant de la 3HP i de composts derivats com són la PN, PM, PLP, 3-hidroxi-2-metilpiridina(3H2MP) i 2-cloro-3hidroxi-piridina(2Cl3HP); així com també l'àcid L-ascòrbic (vitamina C). Els resultats obtinguts em permetrà analitzar la influència dels grups funcionals a l'activitat antioxidant del compost.

3. Metodologia

3.1 Materials/Reactius

Els reactius utilitzats en la investigació realitzada en aquest treball s'han adquirit de les següents empreses comercials:

- Sigma-Aldrich: DPPH, àcid L-ascòrbic, piridoxina, piridoxamina, 5'-fosfat de piridoxal, 2-cloro-3-hidroxipiridina, salicilat de sodi, clorur de ferro(II) tetrahidratat, neocuproina, catalasa, permanganat de potassi, NADH, Nitro Blue Tetrazol (NBT) i Fenazina Meta Sulfonat (PMS).
- Acros Orgànics: 3-hidroxi-2-metilpiridina i 3-hidroxipiridina
- Scharlau: acetat d'amoni, carbonat de sodi, dihidrogen fosfat de sodi, hidrogen fosfat de disodi, peròxid d'hidrogen 30% (v/v) , àcid etilendiamintetracètic, clorur de coure(II) dihidratat, àcid sulfúric (95-98%), àcid clorhídric (1N) i hidròxid de sodi (1N).

3.2 Tècniques experimentals.

3.2.1 Espectroscòpia UV- Visible

L'espectroscòpia UV-visible fou utilitzada per a determinar els espectres del diferents composts antioxidants (PN, PM, PLP, 3HP, 3H2MP, 2Cl3HP i àcid L-ascòrbic); així com la variació de l'absorbància en una longitud d'ona fixada en les diferents reaccions de cada mètode. Els espectres UV-Visible es varen obtenir a través d'un espectrofotòmetre de doble feix *UV-2401 PC Shimadzu* format per dues fonts d'irradiació, una làmpada de D₂ (30W) i una de wolframi (50W) el qual es capaç d'irradiar des de 200 a 800 nm; utilitzant les dissolucions tampó com a referència. Es van fer ús de cel·les de quars i de plàstic amb un centímetre de pas òptic, les quals foren termostatitzades utilitzant un termòstat elèctric *TCC-CONTROLLER Shimadzu* a una temperatura de 25°C i/o 37°C.

3.2.2 pH-metre

Per a poder determinar els diferents valors de pH de les dissolucions tampó preparades així com de les dissolucions dels composts antioxidants i dels composts radicalaris, es va fer ús d'un pH-metre *Crison* model Basic 20⁺ el qual conté un elèctrode de vidre *Crison* model 5029. Aquest dispositiu ha de ser calibrat diàriament per assegurar la seva precisió mitjançant tres dissolucions tampó a pH perfectament conegut (4,01, 7,00 i 9,21).

3.3 Programari informàtic.

3.3.1 Sigmaplot.

El programa informàtic *Sigmaplot*, versió 10.0, s'ha utilitzat per a realitzar les diferents gràfiques presents en aquest treball. Es tracta d'un sistema informàtic en el qual es poden crear gràfiques de manera ràpida i senzilla a través de fulles de càlcul. A més a més, permet l'ajust d'equacions teòriques a les dades experimentals, fent ús d'algoritmes de Marquardt-Levenberg per trobar els paràmetres que aporten un millor ajust entre l'equació teòrica i les dades experimentals; tot i que també presenta l'addició de noves equacions on cal especificar certs paràmetres. Mitjançant les equacions d'ajust que presenta el programa, he pogut determinar els valors de IC₅₀ dels diferents composts antioxidants.

3.3.2 Chemoffice

El programa informàtic *Chemoffice*, versió 15.0, s'ha utilitzat per a realitzar les diferents imatges presents en aquest treball.

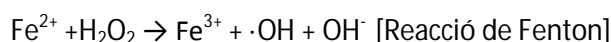
El Chemoffice es tracta d'un sistema informàtic el qual inclou ChemDraw, la principal eina de dibuix d'estructura química i Chem3D, un programa de modelatge molecular; a més d'altres utensilis per a químics i biòlegs, a fi de facilitar el disseny, i la visualització de les estructures químiques.

3.4. Mètodes per a determinar l'activitat antioxidant

3.4.1 Activitat segrestadora de l'·OH (Mètode CUPRAC)

Aquest mètode consisteix en mesclar salicilat i el compost antioxidant amb el radical ·OH per a formar un producte hidroxilat del salicilat que, posteriorment, es fa reaccionar amb una sal de Cu(II)-Neocuproina i es llegeix la seva absorbància a 530 nm. El compost antioxidant competeix amb el salicilat pel radical hidroxil [Özyürek, 2008].

El radical ·OH es genera *in situ* a través de la reacció de Fenton, la qual consisteix en mesclar Fe²⁺ i peròxid d'hidrogen:



La presència del catió Fe²⁺ pot causar d'anys en llocs específics de la molècula segrestadora; per aquesta raó, s'usa l'EDTA com a metall quelant, on es forma Fe(II)-EDTA eliminant la presència de ferro en el lloc de lligadura [Özyürek,2008]. En aquest punt, existeix la presència d'una reacció competitiva entre el salicilat i el compost antioxidant per a la captació del ·OH; com s'indica a la figura 3.1.

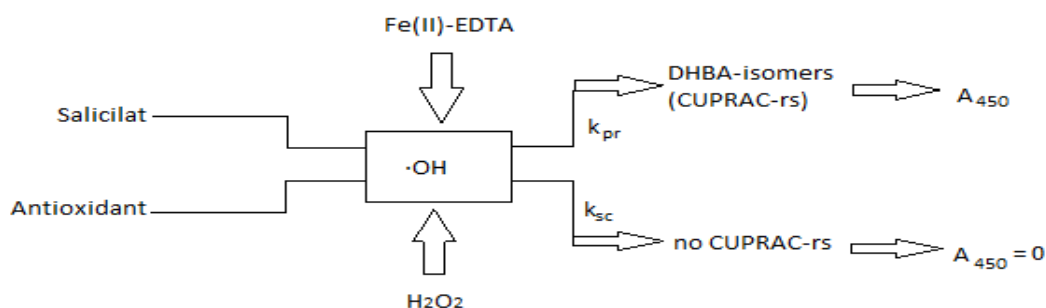


Figura 3.1. Esquema de la reacció de competitivitat entre el salicilat i l'antioxidant pel radical hidroxil.

El $\cdot\text{OH}$ reacciona amb el salicilat, donant lloc a la formació de productes hidroxilats del salicilat, entre els quals destacar els de la figura 3.2.

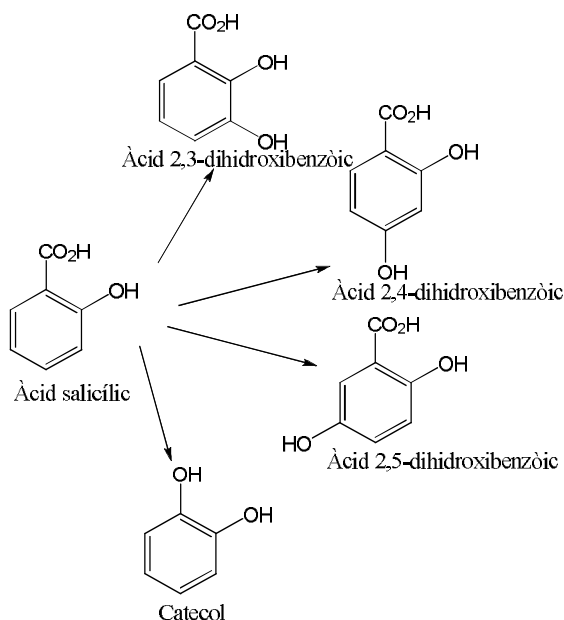
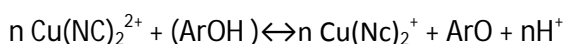


Figura 3.2. Productes hidroxilats formats a partir de l'atac del radical $\cdot\text{OH}$ a l'àcid salicílic.

Posteriorment, s'addiciona la catalasa per eliminar H_2O_2 i així evitar que interfereixi en els processos posteriors. Els productes hidroxilats del salicilat es fan reaccionar amb la neocuproina, i es fa la lectura d'absorbància a 450 nm. La reacció redox en qüestió és relativament ràpida ja que la neocuproina és un agent de transferència d'electrons de l'esfera externa i el color resultant és estable durant un període de temps raonable. El reactiu oxidant cromogènic és el bis-(neocuproina) de coure(II) clorhidratat $[\text{Cu}(\text{II})\text{-Nc}]$, el qual reacciona amb composts fenòlics hidroxilats (ArOH) de la següent manera:



On els protons alliberats poden ser tamponats amb l'acetat d'amoni concentrat. En aquesta reacció, els grups reactius Ar-OH dels polifenols són oxidats a les quinones corresponents i el $\text{Cu}(\text{II})\text{-Nc}$ es redueix a $\text{Cu}(\text{I})\text{-Nc}$ amb un màxim d'absorbància a 450 nm. On el color es deu al quelat $\text{Cu}(\text{I})\text{-NC}$ que es forma [Özyürek, 2011], veure figura 3.3.

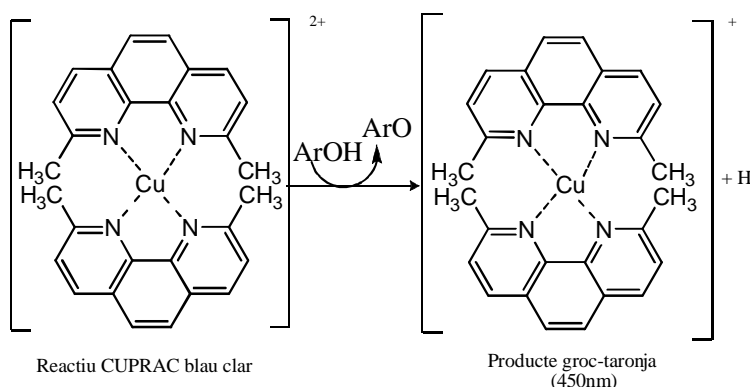


Figura 3.3. La reacció CUPRAC i cromòfor: bis-(neocuproina)-coure(I) de cations quelat.

3.4.1.1 Preparació de dissolucions

Es preparà tampó salicilat 10 mM dissolent 0,160 g de salicilat sòdic en aigua Mil-li Q. Una dissolució de Fe(II) 20 mM dissolent 0,200 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ amb 2 mL de HCl 1 M i diluir a 50 mL amb aigua Mil-li Q. $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 20 mM dissolent 0,372 g de la sal amb aigua Mil-li Q i diluir a 50 mL. H_2O_2 10 mM a partir d'una solució intermèdia 0,5 M preparada a partir de H_2O_2 al 30% i estandaritzat amb permanganat (KMnO_4 0,02 N). El tampó de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 0,2 M a pH 7,4 es prepara amb aigua Mil-li Q. Cu(II) $1,0 \times 10^{-2}$ M es va preparar dissolent 0,430 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, i diluint fins a 25 mL. Solució aquosa d'acetat d'amoni (NH_4Ac , 1,0 M) que contenia 19,270 g de la sal en 250 mL. Neocuproina (Nc) $7,5 \times 10^{-3}$ M va ser preparat dissolent 0,078 g de la base lliure en EtOH, i diluint fins 50 mL amb etanol (preparat fresc). Catalasa original amb una activitat inicial de 3500 U/mg es va diluir amb tampó fosfat 0,2 M (pH 7,4) fins a obtenir una concentració de 268 U/ml (preparat fresc) [Özyürek,2008].

3.4.1.2 Assaig

A un tub d'assaig de color ambre es van afegir 1,5 mL de tampó fosfat (pH 7,4), 0,5 mL de salicilat de sodi 10 mM, 0,25 mL de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 20 mM, 0,25 mL de solució de FeCl_2 20 mM, 2-x mL H_2O , x (mL) de la mostra segrestadora (x varia entre 0,1 i 2,0 mL) a una concentració de 2×10^{-5} M (tots els compostos inhibidors), i 0,5 mL de H_2O_2 10 mM; ràpidament en aquest ordre.

La mescla en un volum total de 5 mL es va incubar durant 10 min en un bany termostatitzat a 37°C. Al final d'aquest període, la reacció es va aturar amb l'addició de 0,5 mL de solució de catalasa (268 U mL^{-1}), i es va agitar durant 30s amb un vòrtex. Per 0,5 ml de la solució incubada, el mètode CUPRAC es va aplicar de la següent manera:

1 mL Cu (II) + 1 mL Nc + 2 mL tampó NH_4Ac + 0,5 mL solució incubada

Es registrà l'espectre de la solució final 5 minuts més tard en front a un blanc (0,5 mL H_2O_2 + 1 mL Cu (II) + 1 mL Nc + 2 mL tampó NH_4Ac), on presenta un màxim d'absorció a 450 nm [Özyürek,2008].

3.4.2 Activitat segrestadora del radical DPPH (modificat)

El DPPH (di(fenil)-(2,4,6-trinitrofenil)iminoazanio) es caracteritza per ser un radical lliure estable gràcies a la deslocalització d'un electró per tota la molècula fent que aquesta no dimeritzi i que presenti una coloració porpra quan forma una dissolució amb metanol a causa de la banda d'absorció que presenta a 517 nm, veure figura 3.4. Es sol fer ús d'aquest mètode per avaluar l'activitat antioxidant de composts fenòlics.

El mètode del DPPH consisteix en diluir el compost antioxidant en metanol i agafar 0,2 mL d'aquest i mesclar-ho amb 2 mL de DPPH. Després de 30 minuts d'incubació a temperatura ambient es llegeix la seva absorbància a 517 nm. La modificació que hem fet ha estat diluir la mostra amb tampó acetat (pH 5,5) i que la preparació del DPPH s'ha realitzat amb etanol absolut, mantenint la relació etanol : acetat (60:40 volum). Un cop passats els 30 minuts d'incubació a temperatura ambient es llegeix la seva absorbància però en aquest cas es fa a 525 nm ja que el màxim del pic es veu desplaçat per la presència d'aigua (procedent del tampó acetat). Es determinarà el percentatge de captació de radicals DPPH a través de l'equació 3.1:

$$\% \text{inhibició del radical DPPH} = \left(\frac{[A_a - A_d]}{A_a} \right) \times 100$$

Equació 3.1

On A_a és l'absorbància abans de la reacció; A_b és l'absorbància després de que la reacció es dugui a terme [Alam, 2013].

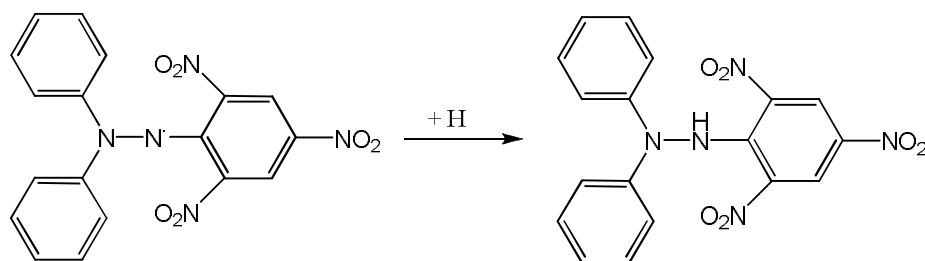


Figura 3.4. Estructura radicalària i no radicalària del DPPH.

3.4.2.1 Preparació de dissolucions

S'han preparat les dissolucions de les mostres amb tampó acetat 100 mM i a pH 5,5. PLP 100 mM dissolent 0,247 g de PLP i diluir a 10mL. 3HP 300 mM dissolent 0,290 g de 3HP i diluir a 10 mL. 3HP 100 mM dissolent 0,047g de 3HP i diluir a 5mL. 3H2MP 300 mM dissolent 0,820g de 3H2MP i diluir a 25 mL. PN 400 mM dissolent 2,050 g de PN i diluir a 25 mL. PN 600 mM dissolent 0,620 g de PN i diluir a 5mL. PM 400 mM dissolent 0,965 g de PM i diluir a 10 mL. PM 200 mM dissolent 0,480 g de PM i diluir a 10 mL. 2Cl3HP 20 mM dissolent 0,026 g de 2Cl3HP i diluïnt a 10 mL. Àcid L-ascòrbic 180 μ M dissolent 0,001 g d'àcid L-ascòrbic i enrasar a 25 mL. DPPH 130 μ M dissolent 0,001 g de DPPH de l'assaig amb etanol absolut fins a 25 mL (preparat fresc).

3.4.2.2 Modificació de l'assaig

A un tub d'assaig de color ambre amb un volum total de mostra a analitzar de 3 mL es van fer diferents addicions mantenint sempre la relació etanol: acetat (60:40 volum) a fi de variar la concentració de l'antioxidant. El 40% en acetat inclou: tampó acetat i antioxidant preparat amb acetat; i el 60% en etanol inclou: etanol i DPPH preparat amb etanol. La mostra a analitzar es va mantenir a temperatura constant durant 30 minuts en un bany termostatitzat a 25°C i després es van fer les lectures d'absorbància a 525 nm, per posteriorment determinar el percentatge de captació de radicals DPPH.

3.4.3 Activitat segrestadora del $\cdot\text{O}_2^-$

L'anió superòxid tot i ser un oxidant dèbil pot produir radicals hidroxil, així com oxigen atòmic, el qual contribueix a l'estrès oxidatiu [Meghashri, 2010]. L'activitat segrestadora del radical superòxid es basa en la reducció de Nitro Blue Tetrazol (NBT) en presència de NADH i Fenazina Meta Sulfonat (PMS) sota condicions aeròbiques. La lectura d'absorbància és a 560 nm del NBT reduït. Veure figura 3.5.

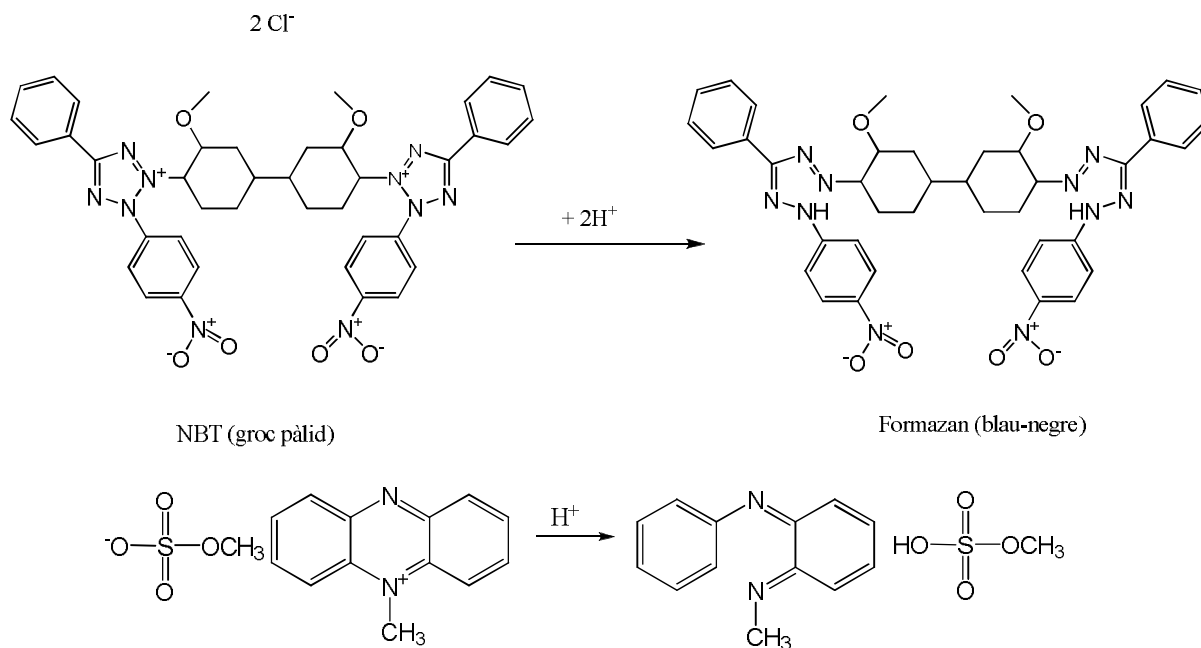


Figura 3.5. Formes oxidades i reduïdes del NBT i PMS, respectivament.

3.4.3.1 Preparació de dissolucions

S'han preparat diferents concentracions de mostres amb tampó fosfat 100 mM i pH 7,4. PLP 100 mM dissolent 0,247 g de PLP i diluir a 10 mL. 3HP 300 mM dissolent 0,285 g de 3HP i diluir a 10 mL. 3H2MP 120 mM dissolent 0,657 g de 3H2MP i diluir a 50 mL. PN 300 mM dissolent 1,235 g de PN i diluir 20 mL. PM 200 mM dissolent 0,964 g de PM i diluir a 20 mL. 2Cl3HP 20 mM dissolent 0,026 g de 2Cl3HP i diluïnt a 10 mL.

PMS 30 μM a partir d'una dissolució mare de PMS 457 μM preparada a partir de la pesada de 0,0020 g PMS i diluïda a 10 mL amb tampó fosfat. D'aquesta dissolució mare agafam 0,65 mL i el diluïm fins a 10 mL amb el tampó fosfat i obtenim la dissolució de PMS 30 μM. NADH 338 μM dissolent 0,003 g NADH i diluïnt a 10 mL amb tampó fosfat. NBT 72 μM a partir d'una dissolució mare de NBT 300 μM preparada a partir de la pesada de 0,025 g NBT i diluïda a 10 mL amb tampó fosfat. D'aquesta dissolució mare agafam 2,4 mL i la diluïm fins a 10 mL amb el tampó fosfat i obtenim la dissolució de NBT 338 μM [Sun,2015].

3.4.3.2 Assaig

A un tub d'assaig de color ambre s'addicionen 0,7 mL de NADH, 0,7 mL NBT, 0,7 mL solució segrestadora i 0,7 mL PMS (volum total de mostra a analitzar de 2,8 mL). Es deixen passar 5 minuts a una temperatura de 25°C i es llegeix la seva absorbància a 560 nm.

4. Resultats i discussions

4.1 Espectres UV-Visible dels composts antioxidants

En primer lloc, he determinat l'espectre UV-Visible dels composts estudiats dins tampó fosfat. Com podem observar en la figura 4.1, la majoria dels composts, a excepció del PLP, no absorbeixen a la regió entre 360-500 nm; fet que serà important en la utilització del mètode CUPRAC, DPPH, i activitat segrestadora del ·O₂⁻ ja que aquest mètodes requereixen lectures d'absorbància entre 400-500 nm.

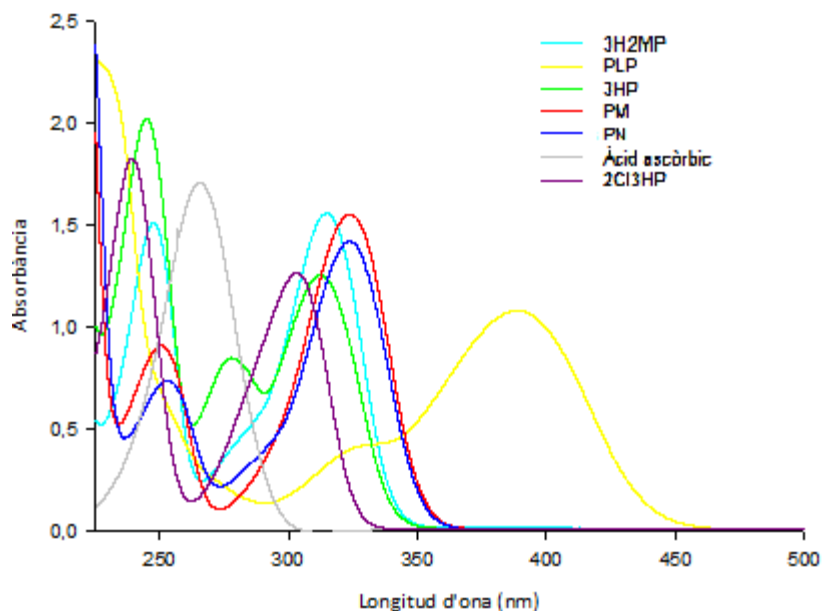


Figura 4.1. Espectre dels composts antioxidants dins tampó fosfat a 25°C.

4.2 Activitat segrestadora del ·OH (mètode CUPRAC)

En la determinació de l'activitat segrestadora del radical hidroxil, s'ha de tenir en compte la reacció competitiva que existeix entre el salicilat i el compost antioxidant, que modificarà l'absorbància del quelat Cu(I)-Nc.

A la figura 4.2 es mostra l'espectre visible del quelat Cu(I)-Nc produït com a resultat de la reacció CUPRAC amb les dissolucions amb presència i absència de PLP.

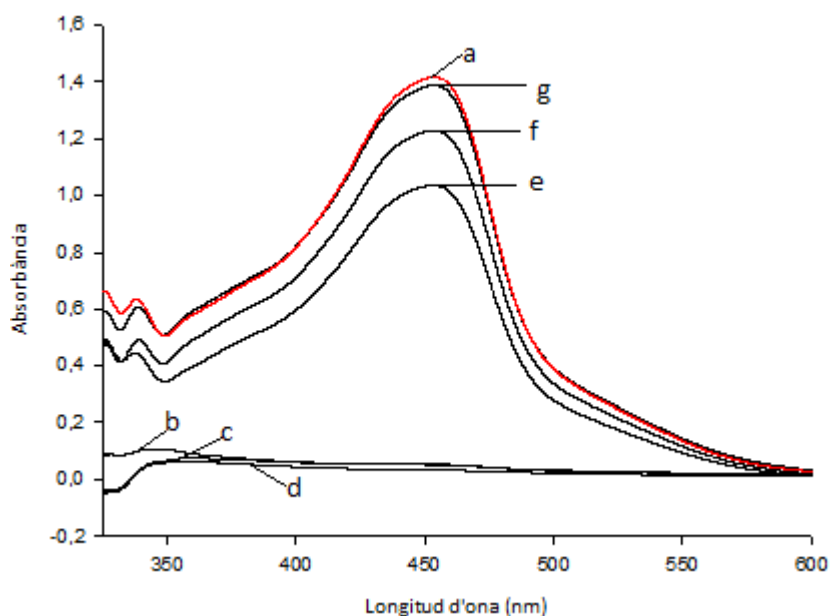


Figura 4.2. Espectre visible del Cu(I)-Nc produït com a resultat de la reacció CUPRAC amb **(a)** Fe(II)-EDTA + salicilat + H₂O₂; **(b)** Fe(II)-EDTA + H₂O₂ + PLP(2·10⁻⁵M); **(c)** Fe(II)-EDTA + H₂O₂ + PLP(4·10⁻⁵M); **(d)** Fe(II)-EDTA + H₂O₂ + PLP(6·10⁻⁵M); **(e)** Fe(II)-EDTA + salicilat + H₂O₂ + PLP(2·10⁻⁵M); **(f)** Fe(II)-EDTA + salicilat + H₂O₂ + PLP(4·10⁻⁵M); **(g)** Fe(II)-EDTA + salicilat + H₂O₂ + PLP(6·10⁻⁵M).

En la figura 4.2 es va comprovar la presència d'un màxim a 450 nm quan s'aplicava el mètode CUPRAC a la mescla Fe(II)-EDTA + salicilat + H₂O₂. D'altra banda, vaig observar que quan augmentàvem la concentració de PLP a la mescla amb salicilat, l'absorbància també augmentava; fet que els valors màxims d'absorbància a 450 nm de les reaccions (e), (f) i (g) ens donin uns valors inversos als que esperariem; ja que la diferència entre aquestes reaccions és la concentració de la PLP. El que s'esperava observar era que a major concentració de PLP, menor absorbància a 450 nm, fet que implicaria major capacitat antioxidant del compost. Per altre part, les reaccions (b), (c) i (d), és a dir, compost antioxidant addicionat en absència de salicilat no reaccionaven amb el ·OH ja que no donen cap intensitat en la seva reacció amb Cu(II)-Nc; per aquesta raó no presenten cap màxim d'absorbància a 450 nm ja que no impliquen la formació de productes hidroxilats del salicilat, que són els responsables de reaccionar amb el complex Cu(II)-Nc i proporcionar la banda electrònica centrada a 450 nm.

Aquesta controvèrsia observada en les reaccions (e), (f) i (g) també es va veure en el compost PN; de la mateixa manera ens donava valors d'absorbància menors en concentracions més baixes de PN.

Vaig analitzar que ocorria durant la reacció, que feia que els resultats no donessin bé. Als experiments de la figura anterior, vaig esbrinar que el compost antioxidant addicionat en la primera etapa del mètode o no reaccionava amb l'·OH o reaccionava però no reduïa el Cu(II)-Nc, indicant que la reacció era directament selectiva pel compost salicilat. Addicionalment, vaig realitzar els experiment de la següent manera: fosfat, salicilat, EDTA, FeCl₂, H₂O i H₂O₂; incubació durant 10 minuts i addició de catalasa. Posteriorment, vaig analitzar l'efecte del PLP sota l'assaig del salicilat en absència de PLP, és a dir, vaig agafar 1 mL Cu(II), 1 mL Nc, 2 mL NH₄Ac, 0,4 mL solució incubada i 0,1 mL PLP. Els resultats obtinguts foren els de la figura 4.3.

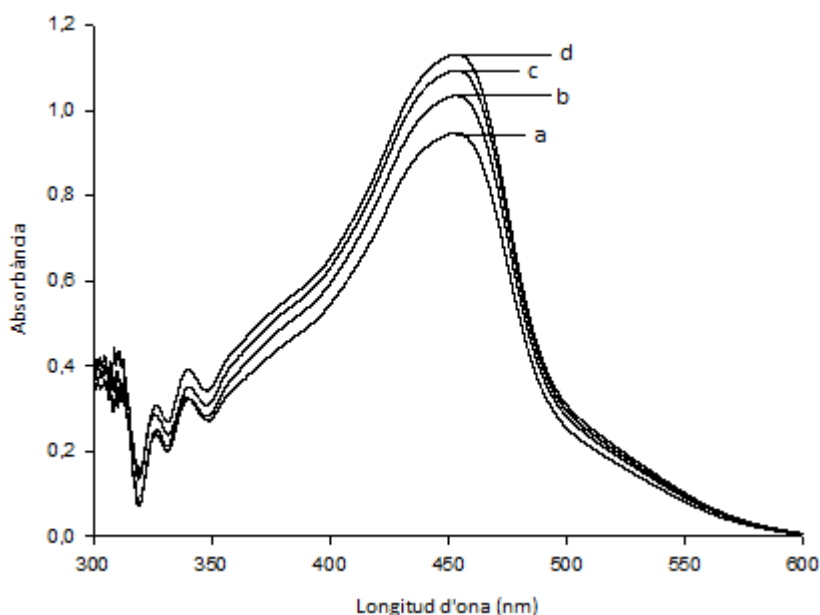


Figura 4.3. Espectre visible del Cu(I)-Nc produït com a resultat de la reacció CUPRAC amb (a) Cu(II)+ Nc + NH₄Ac + solució incubada + H₂O (b) Cu(II)+ Nc + NH₄Ac + solució incubada + PLP(2·10⁻⁵M); (c) Cu(II)+ Nc + NH₄Ac + solució incubada + PLP(4·10⁻⁵M); (d) Cu(II)+ Nc + NH₄Ac + solució incubada + PLP(6·10⁻⁵M).

En la figura 4.3 es comprova que la presència de PLP/PN en la segona part del mètode augmentava la intensitat de la senyal de la reacció CUPRAC, per tant la senyal augmenta en relació a la concentració de PLP. Per tant, el PLP interfereix en el procés redox de Cu(II)-Nc i augmenta la senyal. Per aquesta raó, vaig abandonar el mètode de determinar la capacitat antioxidant del radical ·OH amb el mètode CUPRAC i em vaig centrar amb el altres dos mètodes.

No es va aplicar el mètode per a la resta de composts (3HP, 3H2MP, 2CI3HP i PM), ja que els resultats obtinguts pels dos composts anterior PN i PLP no van tenir èxit; i es suposava que aquests composts pel fet de ser considerats bons antioxidants, ens donarien uns resultats idonis.

4.3 Activitat segrestadora del radical DPPH

4.3.1 Espectre UV-Vis del DPPH

El mètode inicial del DPPH utilitza etanol pur. Per augmentar la solubilitat dels composts estudiats vaig treballar amb una mescla de etanol: dissolució aquosa d'acetat de sodi pH 5,5 (60:40 volum).

En la figura 4.4 es pot veure l'espectre del DPPH dins etanol i el del DPPH dins etanol : acetat (60:40 volum); que ens serví per a determinar la longitud d'ona a la qual realitzar l'assaig.

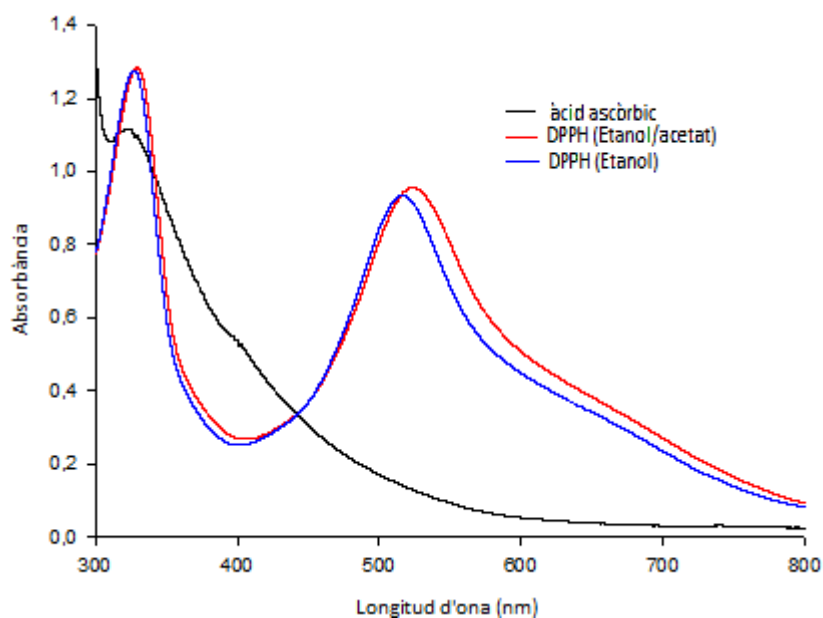


Figura 4.4. Espectre del DPPH (etanol), DPPH(etanol : acetat) i àcid ascòrbic/DPPH/acetat.

Com es pot observar en la figura 4.4, el màxim d'absorbància del DPPH (etanol) i del DPPH (etanol:acetat), corresponen a la longitud d'ona de 517 nm i 525 nm, respectivament. L'elecció de treballar a 525 nm es deu a la polaritat del dissolvent etanol : aigua que desplaça la posició del màxim d'absorbància.

A un experiment addicional, es va afegir àcid ascòrbic a la dissolució de DPPH (etanol : acetat) i després de 30 minuts es va enregistrar el seu espectre que es mostra en la figura 4.4. Es pot comprovar com l'absorbància decau pràcticament a zero a 525 nm, i confirma l'elecció de treballar a aquesta longitud d'ona per determinar la quantitat de DPPH en forma radicalària.

4.3.2 Estabilitat del DPPH

Un cop coneguda la longitud d'ona a la qual fer feina, es va comprovar l'estabilitat del DPPH dins el nou dissolvent emprat, mitjançant la lectura d'absorbància durant 30 minuts de incubació a 25°C i a 525 nm; ja que és el temps necessari del mètode per a poder mesurar finalment la seva absorbància i determinar el percentatge de inhibició de radicals DPPH. En la figura 4.5, podem veure l'estabilitat que presenta el DPPH.

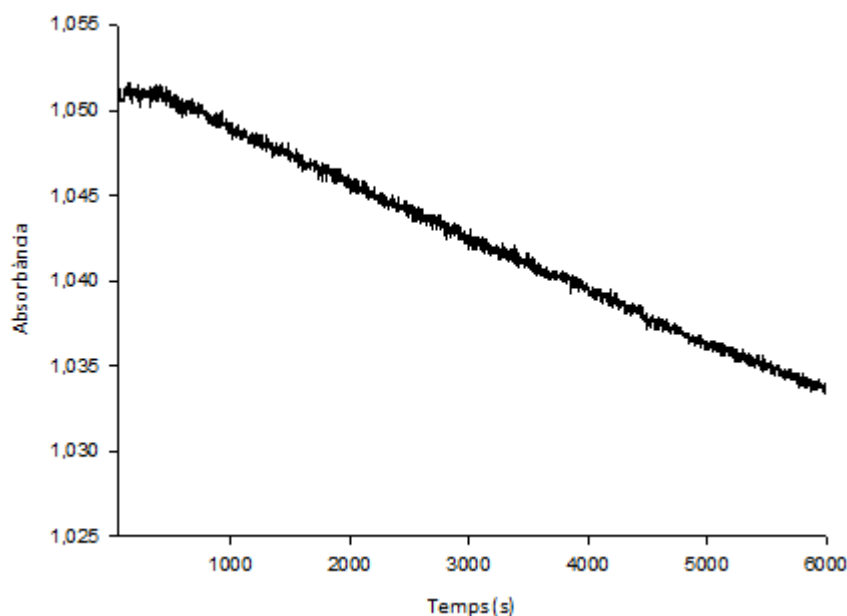


Figura 4.5. Estabilitat del DPPH amb etanol : acetat (60 : 40 volum) a 25°C.

Com podem comprovar en la gràfica 4.5, el DPPH es degrada molt poc amb el temps; en 100 minuts tan sols ha disminuït 0,017 UA (unitats d'absorbància) i tan sols ens interessa la seva estabilitat durant els 30 primers minuts, la qual presenta una degradació de 0,005 UA, essent aquest valor menyspreable i podent considerar que el DPPH no sofreix cap canvi a 25°C durant la realització de l'experiment.

4.3.3 Capacitat antioxidant

Un cop coneguda la longitud d'ona a la qual treballarem i l'estabilitat del DPPH a 25°C, es va determinar el percentatge de captació de radicals DPPH a través de l'equació:

$$\% \text{inhibició del radical DPPH} = ([A_a - A_b] / A_a) \times 100 \quad \text{Equació 4.1}$$

On A_a és l'absorbància de la dissolució de DPPH en absència de compost antioxidant; i A_b és l'absorbància de la dissolució de DPPH en presència de compost antioxidant. Però també s'ha de tenir en compte el valor residual que presenta el compost antioxidant sense la presència del DPPH; per aquesta raó, la fórmula anterior queda de la següent manera:

$$\% \text{inhibició del radical DPPH} = ([A_a - (A_b - A_{\text{residual}})] / A_a) \times 100 \quad \text{Equació 4.2}$$

Mitjançant l'ús de l'equació 4.2 he pogut construir la figura 4.6 i la figura 4.7 on es representa la capacitat inhibidora (%) en front a la concentració dels composts antioxidants estudiats en aquest treball de fi de grau.

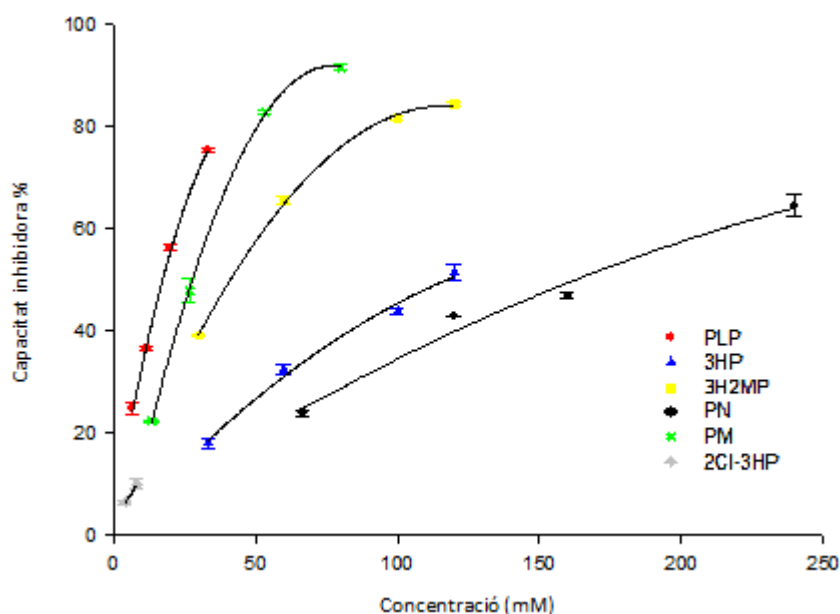


Figura 4.6. Activitat antioxidant dels composts anàlegs a la 3HP sobre el radical DPPH.

A la gràfica 4.6 podem observar la capacitat inhibidora dels composts estudiats en funció de la seva concentració. Per a cada compost, s'ha dut a terme un estudi de 4 concentracions diferents i cada un d'aquests s'ha fet per triplicat; a excepció del 2Cl3HP el qual tan sols he pogut determinar la capacitat inhibidora per a dues concentracions (8 i 4 mM) ja que aquest compost no és soluble a majors concentracions dins la solució emprada. A més a més, es pot veure que els composts PLP, 3H2MP i PM tenen una elevada capacitat inhibidora respecte als composts PN i 3HP.

A la figura 4.7 es mostra la capacitat inhibidora de l'àcid ascòrbic. Aquest compost és un bon antioxidant i amb una concentració de 0,1 mM la seva capacitat és pràcticament del 100% a causa de presentar quatre grups OH. Per aquest motiu, s'ha representat per separat dels altres composts.

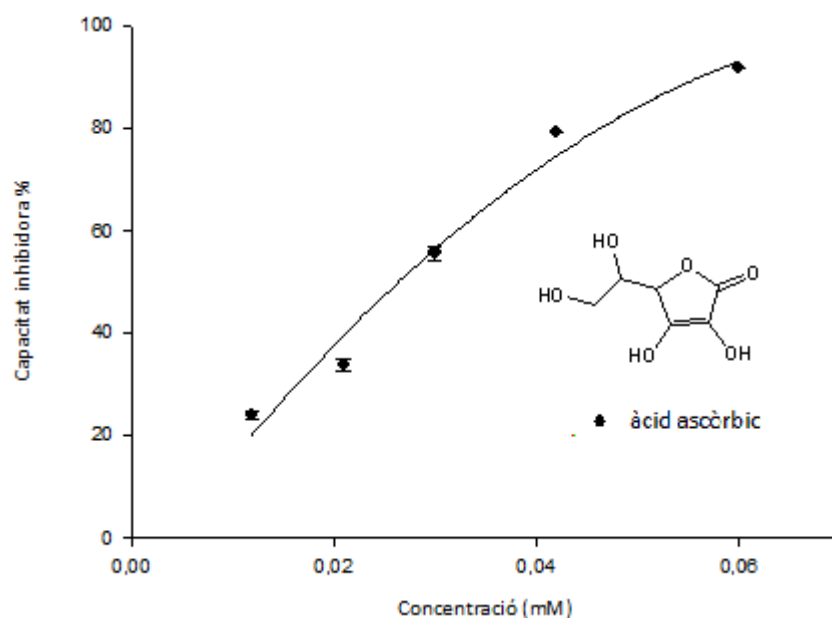


Figura 4.7. Activitat segrestadora sobre el radical DPPH pel composts àcid ascòrbic.

Es va realitzar l'ajust d'una equació d'ordre 2 a les dades experimentals per a cada compost i d'aquesta manera es van obtenir els diferents valors de IC₅₀ per a cada compost estudiat. Veure taula 4.1.

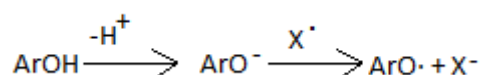
Taula 4.1. Valors de IC₅₀ i pKa dels antioxidants estudiats.

Compost	IC ₅₀ , mM	pKa
3HP	115	8,6 ^{a)}
3H2MP	41,1	9,1 ^{a)}
2Cl3HP	-	6,5 ^{a)}
PN	167	8,9 ^{a)}
PM	27,6	8,2 ^{a)}
PLP	17,1	7,9 ^{a)}
Àcid L-ascòrbic	0,03 ^{b)}	

^{a)}Lide, 2014. ^{b)} El valor de l'IC₅₀ obtingut per a l'àcid ascòrbic concorda amb el valor [Nabavi, 2009] el qual és 0,03 mM.

Nabavi i col. han determinat la capacitat antioxidant de certs composts amb el radical DPPH dins metanol. El valor de IC₅₀ de la PN obtingut per aquests autors és de 50 mM i com podem observar en la taula 4.1 el valor que he obtingut és de 167,4 mM. Aquesta diferència pot ser deguda a la utilització de metanol com a dissolvent; en canvi jo he fet ús d'etanol amb aigua tamponada. A excepció de la PN, la presència de substituents a la 3HP fan disminuir el valor de IC₅₀. A la molècula de PLP hi ha un grup fosfat en el C(5') que no ha d'afectar a la capacitat antioxidant.

Shang i col. [2009] han estudiat l'activitat antioxidant de composts derivats del Resveratrol (compost polifenòlic), i han suggerit que el mecanisme més probable d'acció d'aquests compostos fenòlics amb el DPPH dins etanol és el següent:



La primera etapa consisteix en l'alliberació del protó fenòlic; mentre que a la segona hi ha un procés de transferència electrònica des de l'anió fenoxi al radical DPPH. En tot cas, està descrit que l'energia de dissociació de l'enllaç O-H regula la capacitat antioxidant dels composts fenòlics (Wright, 2001). Per aquest motiu, he comparat la capacitat antioxidant determinada per a cada compost amb el valor de pKa del seu grup fenòlic, veure figura 4.8. Per altre part, si considerem que tan sols existeix el mecanisme d'alliberament del protó de l'OH; en el cas del 2Cl3HP, tenint en compte que el valor de pH de la dissolució emprada (6,5) ≈ pKa, el grup OH estarà desprotonat en un 50%, fet que implica que presenti una capacitat inhibidora baixa.

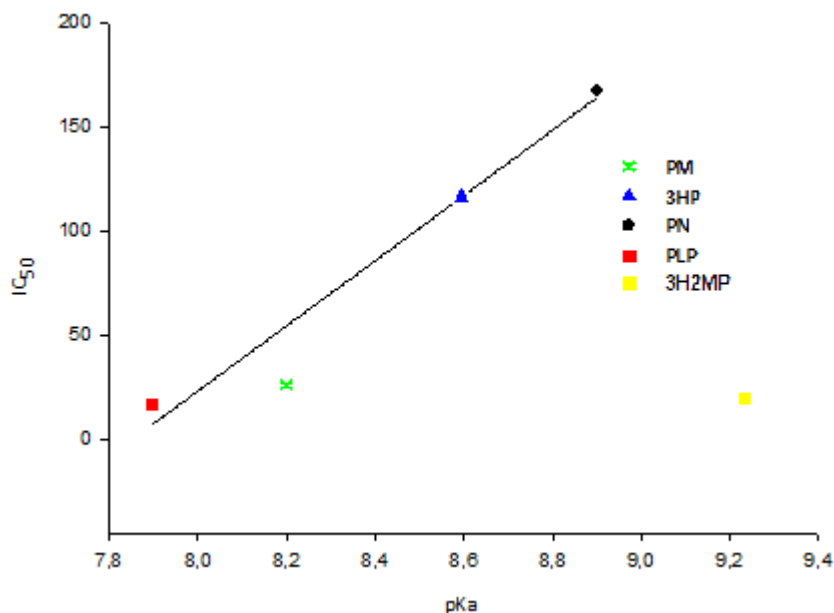


Figura 4.8. IC₅₀ en front pKa.

En la figura 4.8 podem comprovar com els composts PM, 3HP, PN i PLP presenten una dependència lineal del valor de IC₅₀ en front al valor de pKa, fet que ens suggereix que existeix una relació directa entre el valor de IC₅₀ i el valor del pKa per aquests composts. Ara bé, el compost 3H2MP no segueix aquest comportament, fet que suggereix l'existència d'altres mecanismes que expliquen la seva capacitat antioxidant i que intentaré analitzar en estudis posteriors.

La influència dels diferents substituents damunt de la 3HP el que fan és modificar el valor del pKa (energia de dissociació de l'enllaç OH) i en conseqüència modificar la seva capacitat inhibidora.

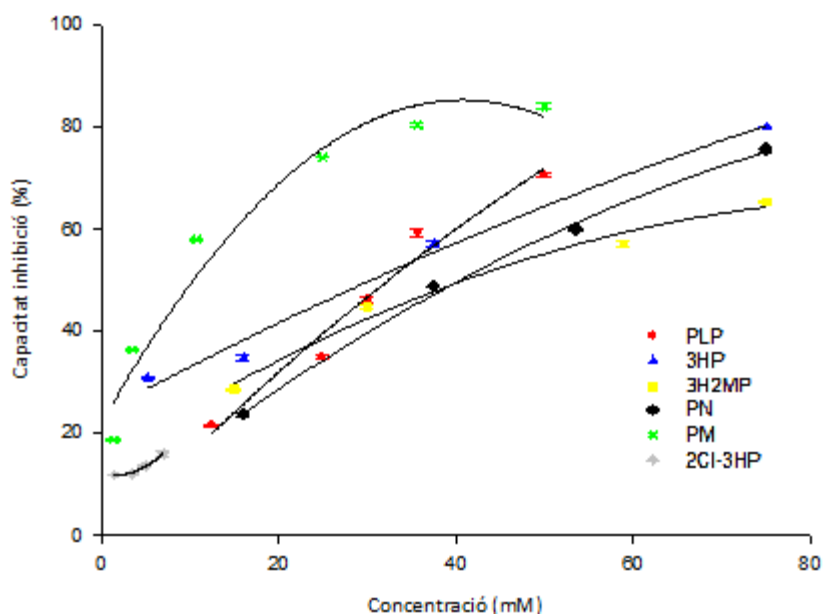
Respecta al DPPH, els millors composts antioxidants estudiats són el PLP i el PM tot i que presenten una capacitat antioxidant molt inferior a la de l'àcid ascòrbic, a causa de que aquest últim presenta quatre grups OH.

4.4 Activitat segrestadora del ·O₂⁻

4.4.1 Capacitat antioxidant

En aquest treball, també he analitzat la capacitat inhibidora dels mateixos composts en front del radical ·O₂⁻. S'ha utilitzat el mètode descrit a la part experimental (3.4.3). A la gràfica 4.9 es mostra la capacitat inhibidora en front de la concentració dels composts. Aquesta capacitat s'ha calculat emprant l'equació 4.2.

De forma semblant al DPPH, he determinat la capacitat inhibidora a diverses concentracions i per triplicat. Malgrat la utilització de dissolvents aquosos tamponats, el compost 2Cl3HP presenta una baixa solubilitat i, únicament, es va determinar fins a una concentració de 7 mM. Veure figura 4.9.



Gràfica 4.9. Activitat segrestadora sobre el radical $\cdot\text{O}_2^-$ pels composts anàlegs a la 3HP.

A la gràfica 4.9 es pot observar com la majoria dels composts augmenten la seva capacitat inhibidora amb la concentració. També he tingut problemes de solubilitat del 2CI3HP. Per aquesta raó, no arriba de nou al valor de IC_{50} a causa dels problemes de solubilitat del compost. D'altra banda, a la gràfica 4.9 és interessant comprovar que el compost amb major activitat segrestadora sobre el radical $\cdot\text{O}_2^-$ no és el PLP, sinó que ho és la PM.

Es va realitzar l'ajust d'una equació d'ordre 2 a les dades experimentals per a cada compost i d'aquesta manera es van obtenir els diferents valors d' IC_{50} per a cada compost estudiat. Els valors obtinguts d' IC_{50} estan a la taula 4.2.

Taula 4.2. Valors de pKa i IC_{50} dels antioxidants estudiats.

Compost	IC_{50} , mM	pKa
3HP	30,3	8,6 ^{a)}
3H2MP	40,8	9,1 ^{a)}
2CI3HP	-	6,5 ^{a)}
PN	40,3	8,9 ^{a)}
PM	10,4	8,2 ^{a)}
PLP	32,3	7,9 ^{a)}

^{a)}Lide, 2014.

Els valors obtinguts de IC_{50} per als composts estudiats respecte al radical $\cdot\text{O}_2^-$ són inferior als determinats pel radical DPPH. Aquestes diferències són degudes a que la capacitat inhibidora d'un compost depèn del radical que s'analitza. En aquest cas, endemés de l'estructura química hi ha moltes diferències en la grandària del radical i en la seva reactivitat química. Amb aquest radical també he volgut relacionar el valor de IC_{50} amb l'energia d'enllaç o amb el pKa del grup fenòlic. A la figura 4.10 s'ha representat el valor de IC_{50} en front del valor de pKa.

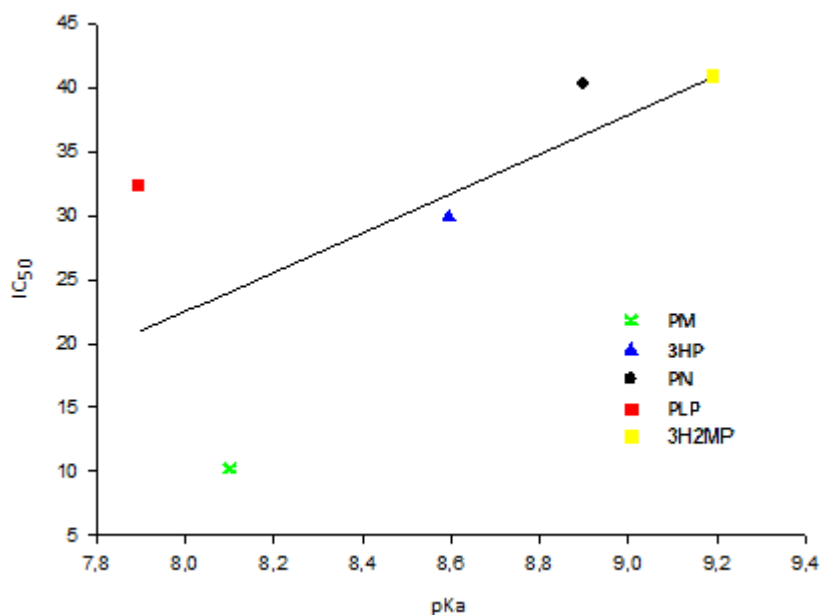


Figura 4.10. IC₅₀ en front pKa.

Com podem observar en la figura 4.10, l'ajust lineal que hauria d'existir entre el valor de IC₅₀ i el valor de pKa no hi és; no existeix cap tendència. Aquesta representació ens indica que pel radical O₂⁻, el mecanisme d'acció no és únicament la transferència d'un protó, sinó que han d'existir altres mecanismes, com el que s'han suggerit en l'apartat 1.3.1; en aquest cas, tendria importància la formació de complexos entre l'agent antioxidant i el radical.

La PM és el compost amb major capacitat antioxidant sobre el radical O₂⁻. Està descrit a la bibliografia que la PM presenta una elevada capacitat per a formar complexos amb ions metàl·lics, com és el Zn²⁺ [Adrover, 2008] i el Cu²⁺ [Ortega, 2009]. Per aquest motiu, la capacitat inhibidora de la PM per aquest radical es veu augmentada per la possibilitat del segon mecanisme d'acció, corresponent a la formació de complexos. En canvi, la molècula de PLP que presenta un grup aldehid a 4', o la 3HP, no tenen tendència a formar complexos i la seva capacitat antioxidant és inferior a la de la PM, fet que implica que el mecanisme més probable per aquests compostos és el de la transferència del protó fenòlic, veure apartat 1.3.1. Per poder corroborar aquestes hipòtesis s'haurien d'analitzar més compostos derivats de la 3HP, a un interval més gran de pKa i amb possibilitat de formar complexos; fet que podré seguir en estudis posteriors.

5. Conclusions

Mitjançant l'anàlisi dels resultats obtinguts es poden extreure les següents conclusions, les quals responen als objectius proposats en el treball de final de grau:

- Els composts anàlegs a la 3HP juntament amb l'àcid ascòrbic, no absorbeixen a la zona entre 360-450 nm, en excepció del PLP; fet que ens ha permès utilitzar els assajos analítics escollits en aquest treball per a determinar la capacitat antioxidant dels composts.
- Dels tres mètodes inicialment escollits per a determinar la capacitat antioxidant del compost 3HP i els seus anàlegs, el mètode per a determinar el radical hidroxil (CUPRAC) no s'ha pogut emprar ja que els composts antioxidants interfereixen en el mètode analític.
- En el mètode del DPPH modificat, s'ha emprat una mescla etanol : aigua (60:40 en volum) a fi d'augmentar la solubilitat dels composts estudiats, fet que ha produït un desplaçament de la longitud d'ona d'estudi del DPPH de 517 nm a 525 nm.
- En el mètode del DPPH, el PLP és el millor compost antioxidant dels anàlegs a la 3HP. He comprovat que existeix una relació lineal entre el valor de IC_{50} i el valor del pKa del grup fenòlic. Aquest fet corrobora que amb aquest radical, el principal mecanisme de reacció correspon a la transferència del protó fenòlic cap al radical DPPH.
- En el mètode de l'activitat segrestadora del radical $\cdot O_2^-$, no he observat cap tendència lineal entre el valor de IC_{50} i el pKa del grup fenòlic. La PM és el millor compost antioxidant dels composts estudiats i això pot ser degut a que en la PM té importància la formació de complexos com a mecanisme d'inhibició d'espècies radicalàries.

6. Abreviacions

Símbol	Descripció
AGEs	Productes finals de la glicació (Advanced glycation end products)
BS	Base de Schiff
DM	Diabetis Mellitus
GLA	Glicolaldehid
GLO	Glioxalasa
GO	Glioxal
MGO	Metil glioxal
NBT	Nitro blue tetrazol
PA	Producte d'Amadori
PL	Piridoxal
PLP	5'-fosfat de Piridoxal
PM	Piridoxamina
PMP	5'-fosfat de Piridoxamina
PMS	Fenazina Meta Sulfonat
PN	Piridoxina
PNP	5'-fosfat de Piridoxina
RAGEs	Receptors dels productes finals de la glicació
RCS	Espècies reactives carboníliques
RL	Radicals lliures
ROS	Especies reactives d'oxigen
UA	Unitats d'absorbància
2Cl3HP	2-cloro-3-hidroxi piridina
3HP	3-hidroxi piridina
3H2MP	3-hidroxi-2-metilpiridina

7. Bibliografia

- [Adrover, 2008] M. Adrover, B. Vilanova, J. Frau, F. Muñoz i J. Donoso. The pyridoxamine action on Amadori compounds: A reexamination of its scavenging capacity and chelating effect. *Bioorgan. Med. Chem.* 16, 5557–5569 (2008).
- [Alam, 2013] N. Alam, N. Jahan i Rafiquzzaman. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Med. J.* 21, 143–152 (2013).
- [Aldini, 2013] G. Aldini, G. Vistoli, M. Stefek, N. Chondrogianni, T. Grune, J. Sereikaite, I. Sadowska-Bartosz i G. Bartosz. *Free Radical Res.* 47(Suppl.1), 93-137 (2013).
- [Chobert, 2006] J.M. Chobert, J.C. Gaudin, M. Dalgalarrodo, T. Haertlé. Impact of Maillard type glycation on properties of beta-lactoglobulin. *Biotechnol. Adv.* 24, 629-632 (2006).
- [Fleming, 2011] T.H. Fleming, P. M. Humpert, P. P. Nawroth i A. Bierhaus. Reactive Metabolites and AGE/RAGE Mediated Cellular Dysfunction Affect the Aging Process – A Mini-Review. *Gerontology*, 57, 435-443 (2011).
- [Galano, 2011] A. Galano, J.R. Alvarez. "Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals". *RSC. Advances* 1, 1763–1771 (2011).
- [Galdez, 2010] G. Galdez, P.M. Mullineaux. The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus. *Physiol. Plantarum*, 138, 430-439 (2010).
- [González, 2000] F.L. González, P.R. Castello, J.J. Gagliardino i J.P. Rossi. La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. *Ciencia al Día Internacional*, 3, No. 2, 0717-3849 (2000).
- [Hunt, 1988] J.V. Hunt, R.T. Dean, S.P. Wolff. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing, *Biochem. J.* 256, 205–212 (1988).
- [Kehrer, 2000] J.P. Kehrer. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149, 43-50 (2000).
- [Khatami, 1988] M. Kathami, Z. Suldan, I. David, W. Li, J.H. Rocky. Inhibitory effects of pyridoxal phosphate, ascorbate and aminoguanidine on onenzymatic glycosylation". *Life Sci.* 43, 1725 (1988).
- [Koenig, 1976] R.J. Koenig, C.M. Peterson, R.L. Jones, C. Saudek, M. Lehrman i A. Cerami. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A_{1c} in Diabetes Mellitus. *J. Med.* 295(8), 417-420 (1976).

- [Kuyvenhoven, 1999]** J.P. Kuyvenhoven, A.E. Meinders. Oxidative stress and diabetes mellitus pathogenesis of long-term complications. *Eur.J.Intern.Med.* 10, 9-19 (1999).
- [Lide, 2014]** D.R. Lide. Handbook of chemistry and physics (2014).
- [Matxain, 2006]** J.M. Matxain, M. Ristila¹, A.k. Strid i L.A. Erikson. Theoretical Study of the Antioxidant Properties of Pyridoxine. *J. Phys. Chem. A.* 110, 13068-13072 (2006).
- [Matxain, 2009]** J.M. Matxain, D. Padro, M. Ristila, Å. Strid, L.A. Eriksson. Evidence of High •OH Radical Quenching Efficiency by Vitamin B₆. *J. Phys. Chem. B.* 113, 9629-9632 (2009).
- [Meghashri, 2010]** S. Meghashri, H. V. Kumar, S. Gopal. Antioxidant properties of a novel flavonoid from leaves of *Leucas aspera*. *Food Chem.* 122, 105-110 (2010).
- [Mossine, 1999]** V. V. Mossine, M. Linetsky , G.V. Glinsky , B.J. Ortwerth i M.S. Feather. Superoxide free radical generation by Amadori compounds: the role of acyclic forms and metal ions. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 230–236 (1999).
- [Mullarkey, 1990]** C. J. Mullarkey, D. Edelstein, M. Brownlee. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173 (3), 932-939 (1990).
- [Nabavi, 2009]** S.F. Nabavi, S.M. Nabavi, Sh. Eslami i M.A. Ebrahimzadeh. Antioxidant activity of some complex vitamins; a preliminar study. *Pharmaceut. Res.* 2, 225-229 (2009).
- [Ortega, 2009]** J. Ortega-Castro, M. Adrover, J. Frau, J. Donoso, F. Muñoz. Cu²⁺ complexes of some AGEs inhibitors. *Chem. Phys. Lett.* 455, 277-284 (2009).
- [Özyürek, 2008]** M. Özyürek, K. Güçlü, R. Apak. Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cúpric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hidrogen peroxide degradation. *Anal. Chim. Acta*, 616(2), 196-206 (2008).
- [Özyürek, 2011]** M. Özyürek, K. Güçlü, R. Apak. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC.* 30(4), 652-664 (2011).
- [Price, 2001]** D.L. Price, P.M. Rhett, S.R. Thorpe and J.W. Baynes. Chelating Activity of Advanced Glycation End-product Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 276, No. 52, 48967–48972 (2001).

- [Rodríguez, 2001]** J.M. Rodríguez, J.R. Menéndez, Y.T. López. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev. Cub. Med. Mil.* 30, 1561-3046 (2001).
- [Shang, 20009]** Y.J. Shang, Y.P. Qian, X.D. Liu, F. Dai, X.L. Shang, W.Q. Jia, Q. Liu, J.G. Fang i B. Zhou. Radical-Scavenging Activity and Mechanism of Resveratrol-Oriented Analogues: Influence of the Solvent, Radical, and Substitution. *J. Org. Chem.* 74 (14), 5025–5031 (2009).
- [Stitt, 2005]** A.W. Stitt. The Maillard reactions in eye diseases. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1043, 582-597 (2005)
- [Sun, 2015]** Y. Sun, B. Yang, Y. Wu, Y. Liu, X. Gu, H. Zhang, C. Wang, H. Cao, L. Huang, Z. Wang. Structural characterization and antioxidant activities of k-carrageenan oligosaccharides degraded by different methods. *Food Chem.* 178, 311-318 (2015).
- [Thornalley, 1999]** P. J. Thornalley, A. Langborg, H. S. Minhas. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* 344, 109-116 (1999).
- [Venereo, 2002]** J.R. Venereo. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cub. Med. Mil.* 31(2), 126-133 (2002).
- [Vilanova, 2011]** B. Vilanova, C. Caldés, M. Adrover, F. Muñoz i J. Donoso. Phenol group in pyridoxamine acts as a stabilizing element for its carbinolamines and Schiff Bases. *Chem. Biodivers*, 8, 1318-1332 (2011).
- [Voziyan, 2002]** P.A. Voziyan, T.O. Metz, J.W. Baynes and B.G. Hudson. A Post-Amadori Inhibitor Pyridoxamine Also Inhibits Chemical Modification of Proteins by Scavenging Carbonyl Intermediates of Carbohydrate and Lipid Degradation. *J. Biol. Chem.* 277(5), 3397–3403 (2002).
- [Voziyan, 2005]** P.A. Voziyan and B.G. Hudson. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell. Mol. Life Sci*, 62, 1671-1681 (2005).
- [Waanders, 2005]** F. Waanders, W.L. Greven, J.W. Baynes, S.R. Thorpe, A.B. Kramer, R. Nagai, N.Sakata, H. van Goor, G. Navis. Renal accumulation of pentosidine in non-diabetic proteinuria-induced renal damage in rats. *Nephrol. Dial. Transpl.* 20, 2060-2070 (2005).
- [Wautier, 2004]** J.L. Wautier, A.M. Schmidt. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ. Res.* 95, 233-238 (2004).