

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

COMPUESTOS FENÓLICOS DE PHAGNALON RUPESTRE  
ACTIVOS EN HIPERSENSIBILIDAD Y LIBERACIÓN DE  
MEDIADORES INFLAMATORIOS

LUIS JESÚS GÓNGORA CARRILLO

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2002

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 7 de Juny de 2002 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Diego Cortés Martínez
- Dra. Dña. M<sup>a</sup> Luisa Ferrándiz Manglano
- Dr. D. José Ramón Pedro Llinares
- Dra. Dña. M<sup>a</sup> Dolores García Jiménez
- Dra. Dña. Roser Vila Casanovas

Va ser dirigida per:

Prof. Dr Salvador Máñez Aliño y Dra. Rosa M<sup>a</sup> Giner Pons

©Copyright: Servei de Publicacions  
Luis Jesús Góngora Carrillo

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5600-4

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

FACULTAT DE FARMÀCIA  
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

**Compuestos fenólicos de Phagnalon rupestre  
activos en hipersensibilidad y liberación  
de mediadores inflamatorios**

**TESIS DOCTORAL**  
presentada por:

**Luis Jesús Góngora Carrillo**  
Valencia, 2002



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

Rosa M<sup>a</sup> GINER PONS y Salvador MÁÑEZ ALIÑO, Profesores Titulares de la Universitat de València,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo presentado por el Ldo. **Luis Jesús Góngora Carrillo**, titulado: “Compuestos fenólicos de Phagnalon rupestre activos en hipersensibilidad y liberación de mediadores inflamatorios.”, ha sido realizado en la Unidad Docente de Farmacognosia y Farmacodinamia del Departament de Farmacologia de la Universitat de València, bajo nuestra dirección.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de esta Tesis Doctoral, para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

València a 22 de Marzo de 2002

Rosa M<sup>a</sup> Giner Pons

Salvador Máñez Aliño

## ABREVIATURAS

AA	ácido araquidónico
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ADP	adenosín difosfato
ADN	ácido desoxirribonucleico
AGPI	ácido graso poliinsaturado
APC	célula presentadora de antígenos
ATP	adenosín trifosfato
A23187	ionóforo de calcio A23187
BHT	2,6-di ( <i>tert</i> -butil)-4-metilfenol
BOC	N- <i>tert</i> -butoxicarbonil-L-alanina- <i>p</i> -nitrofenil éster
CCF	cromatografía de capa fina
CG	cromatografía de gases
CHS	hipersensibilidad por contacto
COX-2	ciclooxigenasa-2
DAD	detector de barrido por fotodiodos
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DMSO	dimetilsulfóxido
DNFB	2,4-dinitro-1-fluorobenceno
DPP	13-acetato de 12-desoxiforbol
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DPT	13-fenilacetato de 12-desoxiforbol
DTH	hipersensibilidad de tipo retardado
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EIA	enzimoinmunoensayo
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GM-CSF	factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos
GSH	glutación reducido
HBSS	solución salina equilibrada de Hank
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
5-HETE	ácido 5(S)-hidroperoxieicosa-6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> -tetraenoico
5-HPETE	ácido 5(S)-hidroxieicosa-6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> -tetraenoico
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular 1
IC <sub>50</sub>	concentración inhibidora 50
IFN	interferón
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico-sintasa inducible
i.p.	intraperitoneal
KC	queratinocito
LC	célula de Langerhans
LDL	lipoproteína de baja densidad

LT	leucotrieno
LX	lipoxina
5-LOX	5-lipoxigenasa
MAPK	proteín quinasa activada por mitógeno
MDA	malondialdehído
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
MPO	mieloperoxidasa
MeOH	metanol
MS	espectroscopía de masas
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato reducido
NBT	azul de nitrotetrazolio
NF8B	factor de transcripción nuclear kappa B
PBS	tampón fosfato salino
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	prostaglandina
PKC	proteín quinasa C
PLA <sub>2</sub>	fosfolipasa A <sub>2</sub>
PMN	polimorfonuclear
RIA	radioinmunoensayo
RNS	especie reactiva derivada del nitrógeno
ROS	especie reactiva derivada del oxígeno
s.c.	subcutáneo
SOD	superóxido dismutasa
SRBC	eritrocitos de cordero
TBA	ácido 2-tiobarbitúrico
<i>t</i> -BuOOH	<i>tert</i> -butilhidroperóxido
TCA	ácido tricloroacético
TNF	factor de necrosis tumoral
TPA	13-acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
TX	tromboxano
UV	ultravioleta
XO	xantina oxidasa

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
<b>II.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>II.2. <i>PHAGNALON RUPESTRE</i> (L.) DC.</b> .....	7
<b>II.2.1. SITUACIÓN TAXONÓMICA</b> .....	7
<b>II.2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA</b> .....	8
<b>II.2.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA</b> .....	9
II.2.3.1. Alcanos .....	9
II.2.3.2. Benzoquinonas .....	10
II.2.3.3. Flavonoides.....	10
II.2.3.4. Terpenoides y esteroides .....	11
II.2.3.5. Acetofenonas.....	13
II.2.3.6. Otros .....	13
<b>II.2.4. USO POPULAR</b> .....	14
<b>II.2.5. FARMACOLOGÍA</b> .....	15
<b>II.3. HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA</b> .....	18
<b>II.3.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	18
II.3.1.1. Fase de sensibilización.....	19
II.3.1.2. Fase de desencadenamiento .....	21
II.3.1.3. Diferencias entre CHS y DTH.....	22
<b>II.3.2. ESPECIES VEGETALES Y PRINCIPIOS DE ORIGEN NATURAL ACTIVOS EN             MODELOS DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA</b> .....	23
<b>II.4. DERIVADOS CAFEICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	30
<b>II.4.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	30
<b>II.4.2. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO</b> .....	32
II.4.2.1. Especies reactivas más importantes.....	33
II.4.2.1.1. Fuentes .....	33
II.4.2.1.2. Reacciones con componentes celulares.....	35

II.4.2.2. Sistema de defensa antioxidante .....	36
II.4.2.3. Papel fisiológico y fisiopatológico de ROS .....	37
<b>II.4.3. DERIVADOS CAFEICOS</b> .....	43
II.4.3.1. Ácidos cafeico y clorogénico como antioxidantes .....	44
II.4.3.2. Derivados dicafeilquínicos como antioxidantes .....	45
II.4.3.3. Otras actividades de derivados dicafeilquínicos .....	46
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	49
<b>III.1. PRUEBAS FARMACOLÓGICAS <i>IN VIVO</i></b> .....	49
<b>III.1.1. ANIMALES</b> .....	49
<b>III.1.2. REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA</b> .....	49
III.1.2.1. Reacción inducida por 2,4-dinitro-1-fluorobenceno .....	49
III.1.2.2. Reacción inducida por eritrocitos de cordero .....	51
<b>III.2. PRUEBAS FARMACOLÓGICAS <i>IN VITRO</i></b> .....	53
<b>III.2.1. ANIMALES</b> .....	53
<b>III.2.2. TAMPONES</b> .....	53
<b>III.2.3. DISOLUCIONES</b> .....	54
<b>III.2.4. OBTENCIÓN DE NEUTRÓFILOS</b> .....	56
III.2.4.1. Obtención de neutrófilos peritoneales de rata .....	56
III.2.4.2. Obtención de neutrófilos humanos .....	56
<b>III.2.5. RECUENTO CELULAR</b> .....	57
<b>III.2.6. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD</b> .....	57
<b>III.2.7. ENSAYO DE ACTIVIDAD 5-LOX EN NEUTRÓFILOS PERITONEALES</b>	
<b>DE RATA</b> .....	58
III.2.7.1. Extracción en fase sólida .....	62
III.2.7.2. Análisis de LTB <sub>4</sub> por HPLC .....	63
<b>III.2.8. ENSAYO DE LIBERACIÓN/ACTIVIDAD DE ELASTASA DE NEUTRÓFILOS</b>	
<b>HUMANOS</b> .....	64
III.2.8.1. Ensayo de la liberación de elastasa .....	64
III.2.8.2. Ensayo de la actividad elastasa .....	65
<b>III.2.9. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE MIELOPEROXIDASA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS</b> .....	66



**ARTÍCULO 3**

“*Phagnalon rupestre* as a source of compounds active on contact hypersensitivity”

*Planta Med.* (2002, en prensa)

**ARTÍCULO 4**

“Phenolic glycosides from *Phagnalon rupestre*”

*Phytochemistry* 59: 857-860 (2002)

**ARTÍCULO 5**

“Phenolic methylquinates from *Phagnalon rupestre* are competitive inhibitors of xanthine oxidase and impair lipid peroxidation”

*Free Radic. Res.* (enviado)

**ARTÍCULO 6**

“Effects of caffeoyl conjugates of isoprenyl-hydroquinone glucoside and quinic acid on leukocyte function”

*Life Sci.* (enviado)

## **INTRODUCCIÓN**

## I. INTRODUCCIÓN

Es sabido que dentro de la familia de las Asteráceas (Compuestas) se encuentran numerosas especies de interés farmacológico, de ellas, algunas muy conocidas por sus propiedades antiinflamatorias como manzanillas, caléndula, partenio, aquilea, énula, etc. Por esta razón, y por la variedad de su representación en la vegetación autóctona, no han pasado desapercibidas para nuestro grupo de investigación. Así, en los últimos años, se han estudiado con cierto detalle químico y farmacológico especies como *Helichrysum stoechas*, *H. italicum*, *Santolina chamaecyparissus*, *Inula viscosa* o *Tanacetum vulgare*. De acuerdo con esa experiencia iniciamos una búsqueda de principios antiinflamatorios, acotada a la tribu Inuleas, a la que pertenecen, además de *Helichrysum* e *Inula*, otros géneros de distribución mediterránea, y acotada también, bajo un prisma farmacológico, a la inflamación alérgica mediada por células (hipersensibilidad retardada o de tipo IV).

Los trabajos de la presente tesis tienen su antecedente directo en un estudio con extractos que permitió escoger *Phagnalon rupestre* entre otras especies próximas por sus efectos sobre hipersensibilidad retardada clásica y por contacto, sin que mediara, contrariamente a lo que había sido habitual en líneas anteriores, un indicio directo de su efectividad por razones etnofarmacológicas. La presentación individualizada de las publicaciones que viene a continuación nos exime, en cierto modo, de proseguir en la explicación del contenido de esta memoria, en aras de la simplicidad que creemos esencial en esta modalidad de tesis doctoral.

Así pues, los artículos mencionados son:

**Artículo 1:****On the activity of trifluoperazine and palmitoylcarnitine in mice: delayed hypersensitivity models. *Life Sci.* 66: 183-188 (2000)**

En la reacción de hipersensibilidad retardada por contacto, tras la aplicación epicutánea del alérgeno, parece relevante el papel que desempeña la proteína quinasa C (PKC) en la migración de las células de Langerhans de la epidermis a los nódulos linfáticos. Es por ello que se evalúa en este artículo los efectos de dos inhibidores de PKC, palmitoilcarnitina y trifluoperazina, en dos modelos de hipersensibilidad retardada en ratón. Estos fármacos son ensayados en dos protocolos de administración diferentes, uno de pre-tratamiento y otro de post-tratamiento, a dosis diferentes de desencadenamiento de la reacción. A su vez, son comparados con dos inmunosupresores, azatioprina y metotrexato, y el glucocorticoide dexametasona.

**Artículo 2:****New prenylhydroquinone glycosides from *Phagnalon rupestre*. *J. Nat. Prod.* 64: 1111-1113 (2001)**

En este artículo se describe el proceso de aislamiento, purificación y elucidación estructural de tres prenilhidroquinonas a partir del subextracto aceto-etílico de *Phagnalon rupestre*, subarbusto ampliamente distribuido por la región mediterránea perteneciente a la familia Asteráceas. Dichos compuestos se describen por primera vez en la naturaleza.

**Artículo 3:*****Phagnalon rupestre* as a source of compounds active on contact hypersensitivity. *Planta Med.* (2002, en prensa)**

En este artículo se determina la actividad del extracto metanólico en modelos de hipersensibilidad retardada, tanto de tipo tuberculínico como por

contacto. La aplicación de un aislamiento guiado por bioensayo lleva a la caracterización de ocho compuestos (tres prenilhidroquinonas, cuatro conjugados dicafeilquínicos y un flavonoide) a partir del subextracto acetotílico. Todos ellos fueron posteriormente ensayados en el modelo *in vivo* de hipersensibilidad retardada por contacto inducida por 2,4-dinitro-1-fluorobenceno.

#### **Artículo 4:**

##### **Phenolic glycosides from *Phagnalon rupestre*. *Phytochemistry* 59: 857-860 (2002)**

Este trabajo es fruto de la profundización en la investigación de la fitoquímica del subextracto butanólico de *Phagnalon rupestre*, como consecuencia de la actividad mostrada en el modelo de hipersensibilidad por contacto, comentada en el artículo 3. El estudio resultó en la identificación de tres compuestos no descritos hasta el momento en la naturaleza, un lignano, una acetofenona y una prenilhidroquinona, así como de otros cuatro conocidos, tres glucósidos de flavonas y una acetofenona. Estos fueron identificados y caracterizados mediante la utilización de técnicas espectroscópicas.

#### **Artículo 5:**

##### **Phenolic methylquinates from *Phagnalon rupestre* are competitive inhibitors of xanthine oxidase and impair lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* (enviado)**

En este artículo se evaluaron las actividades antioxidantes y antiradicalarias de siete compuestos fenólicos aislados del subextracto acetotílico, tres hidroquinonas y cuatro conjugados dicafeilquínicos. Los compuestos fueron ensayados en modelos de peroxidación lipídica, tanto enzimática como no enzimática, captación de la especie radicalaria 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH), así como en la producción de radical superóxido en

el sistema hipoxantina/xantina oxidasa. El estudio de la acción de los dos conjugados dicafeil-metilquinatos sobre la enzima xantina oxidasa nos permitió determinar un potente efecto inhibitor de tipo competitivo y reversible para el éster metílico del ácido 4,5-dicafeilquínico.

**Artículo 6:**

**Effects of caffeoyl conjugates of isoprenyl-hydroquinone glucoside and quinic acid on leukocyte function. *Life Sci.* (enviado)**

En este último artículo, son evaluadas las actividades de los siete compuestos fenólicos referidos en el artículo anterior, frente a diversos parámetros relacionados con la función neutrofílica. Así, se estudiaron los siguientes factores: la liberación de elastasa, la actividad mieloperoxidasa y la producción de leucotrieno B<sub>4</sub> y radical superóxido. Finalmente, es comentada la influencia del tipo de estructura en las actividades mostradas por dichos compuestos.

### **Justificación de la unidad temática de la Tesis Doctoral**

Aunque las seis publicaciones que integran esta Tesis presentan objetivos concretos y metodologías diferentes, existe un hilo conductor entre ellos que los va enlazando para formar un cuerpo que, si bien no se puede considerar cerrado, si que posee la necesaria unidad, según los siguientes criterios:

1. Bajo el punto de vista fitoquímico, los compuestos aislados e identificados pertenecen a la misma especie botánica y tienen carácter fenólico, bien típicamente fenilpropanoide, como los flavonoides, los ácidos cafeilquínicos y el lignano, bien isoprenilbenceno, como la acetofenona derivada de la tremetona o las prenilhidroquinonas.
2. Bajo el punto de vista farmacológico, todos los trabajos realizados de esta índole tratan del efecto de compuestos antiinflamatorios, destacando los estudios *in vivo* sobre inhibición de la reacción de hipersensibilidad por contacto, así como de la inhibición de la liberación de mediadores de neutrófilos.
3. El trabajo sobre la inhibición de peroxidación lipídica e interacción con radicales libres *in vitro* guarda relación con la química de los fenoles y, por otra parte, aborda uno de los aspectos posiblemente clave en el desarrollo de los procesos de hipersensibilidad retardada, según se está esclareciendo actualmente.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **II.1. INTRODUCCIÓN**

De acuerdo con los temas que aparecen en el conjunto de artículos que conforman esta Tesis Doctoral, en este apartado de revisión consideramos tres partes claramente diferenciadas en las que se tratan aspectos tanto fitoquímicos como farmacológicos.

En el apartado II.2 se detallan los compuestos aislados de las especies del género *Phagnalon*, así como las actividades descritas para los mismos. Posteriormente, en el apartado II.3, se realiza una descripción del proceso inflamatorio de tipo alérgico relacionado con las reacciones de hipersensibilidad retardada, revisándose aquellos productos de origen natural activos en dichos modelos. Finalmente, en el apartado II.4, el estudio se centra en los conjugados cafeicos, más concretamente en los ésteres dicafeoilquínicos, y su actividad antioxidante.

### **II.2. *PHAGNALON RUPESTRE* (L.) DC.**

El género *Phagnalon* (Asteraceae) está representado por 30 especies euroasiáticas, seis de las cuales son típicas de la zona mediterránea europea (Tutin *et al.* 1976; Engler *et al.* 1964).

#### **II.2.1. SITUACIÓN TAXONÓMICA**

Según Tutin *et al.* (1976)

DIVISIÓN	Spermatophyta
SUBDIVISIÓN	Magnoliophytina
CLASE	Magnoliatae

SUBCLASE	Asteridae
ORDEN	Asterales
FAMILIA	Asteraceae (Compositae)
TRIBU	Inuleae
GÉNERO	<b>Phagnalon</b>
ESPECIE	<i>Phagnalon rupestre</i> (L.) DC.

### II.2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La especie *Phagnalon rupestre* (L.) DC., también conocida con el nombre castellano de Pelucilla y el valenciano de Herba del Renyó, es un subarbusto perenne leñoso erecto que mide hasta 30 cm, con los tallos y el envés de las hojas cubiertos de borra blanca, con capítulos de 1 cm, aproximadamente, largamente pedunculados, solitarios, pardo amarillentos y globulares. Florece entre los meses de marzo y junio. Presenta brácteas involu-



crales pardo brillantes, rígidas, secas y estrechamente aplicadas al capítulo, siendo las exteriores ovales, mientras que las interiores son lineares. Posee hojas oblongo-lanceoladas, de color verde, con borra a modo de telaraña por el haz y blanco tomentosas por el envés, presentando el margen ondulado y algo revuelto.

Desde el punto de vista ecológico se trata de un caméfito sufruticoso comúnmente distribuido por el área mediterránea, pudiendo encontrarse en cualquiera de las tres provincias de la Comunidad Valenciana, dispersa por las comarcas litorales y sublitorales. Se puede encontrar en zonas de mediana a baja altitud, con clima termo a mesomediterráneo, viviendo sin problemas en lugares que poseen un ombroclima desde semiárido hasta subhúmedo, siendo una especie heliófila que no precisa para su subsistencia de unas características especiales de suelo (Polunin 1982; Mateo y Crespo 1990).

### **II.2.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA**

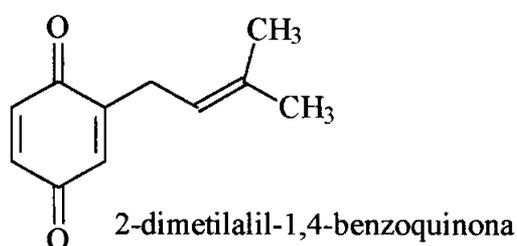
Existe ciertamente pocas publicaciones acerca de la fitoquímica del género *Phagnalon*. El estudio de varias especies de este género ha llevado a la identificación de una serie de productos pertenecientes a distintos grupos fitoquímicos. Entre ellos se pueden encontrar los siguientes:

#### **II.2.3.1. Alcanos**

Mediante cromatografía gaseosa de los componentes n-parafínicos de *Phagnalon rupestre* se ha determinado la presencia de una mezcla de alcanos, entre los que predomina el de longitud de cadena de 31 átomos de carbono, sin detectarse alcanos con más de 25 ni menos de 31 átomos de carbono (Bicchi *et al.* 1975). Posteriormente, mediante cromatografía de gases y espectroscopía de masas e infrarrojos se determinó la presencia de n-octadecano y trimetil dodecano (Bicchi *et al.* 1979).

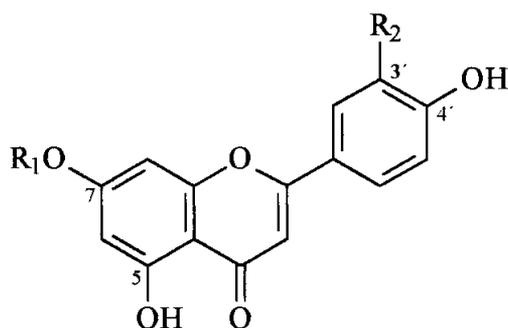
### II.2.3.2. Benzoquinonas

El compuesto 2-dimetilalil-1,4-benzoquinona se ha aislado de *Phagnalon rupestre* (L.) DC., *P. sordidum* (L.) Rechb., *P. saxatile* (L.) Cass., *P. atlanticum* Ball. y *P. purpurescens* Sch. Bip. (Hausen y Schulz 1977; Zdero *et al.* 1991).



### II.2.3.3. Flavonoides

Tres flavonoides ampliamente distribuidos en la naturaleza, apigenina, apigenina-7-glucósido y luteolina han sido también aislados de *Phagnalon rupestre* y *P. saxatile* (Dolci y Tira 1984).



	$R_1$	$R_2$
Apigenina	H	H
Apigenina-7-glucósido	Glu	H
Luteolina	H	OH

#### II.2.3.4. Terpenoides y esteroides

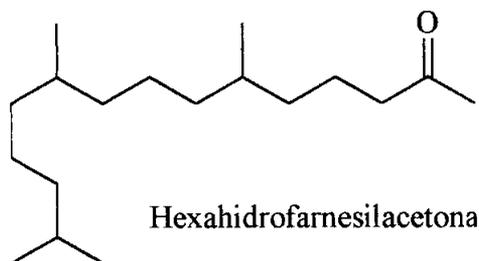
Dentro de este grupo fitoquímico se han identificado compuestos de naturaleza mono-, sesqui-, di- y triterpénica. Así, se ha descrito la presencia de:

##### 1. Monoterpenos

Tanto el compuesto timol, de muy amplia distribución en la naturaleza, como el  $\beta$ -terpineol, fueron identificados en la especie *Phagnalon rupestre* (Bicchi *et al.* 1979).

##### 2. Sesquiterpenos

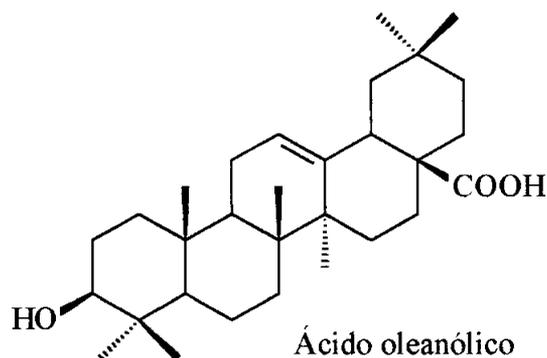
Analizando los vapores de destilación de *Phagnalon rupestre* se ha encontrado el compuesto de naturaleza sesquiterpénica hexahidrofarnesilacetona (Bicchi *et al.* 1979).



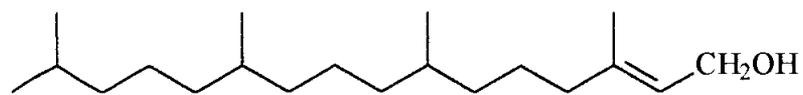
### 3. Diterpenos, triterpenos y esteroides

Aislado de la especie *P. sinaicum*, fue identificado el escualeno, precursor de triterpenos (el-Dahmy *et al.* 1994).

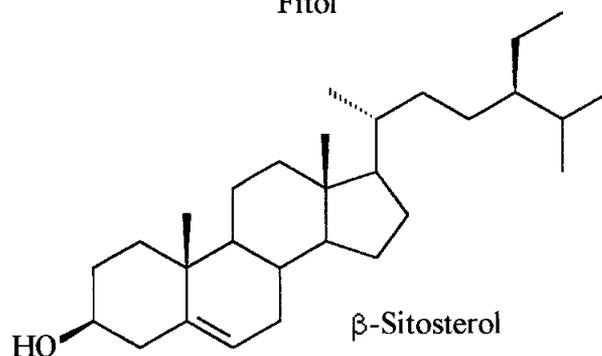
A partir de varias especies del género *Phagnalon* se han aislado compuestos de naturaleza triterpénica. Así, de la especie *P. purpurescens*, Zdero *et al.* (1991) identificaron el ácido oleanólico. De la misma manera, se ha descrito la presencia del triterpeno de esqueleto esteroídico dammadienilacetato en las especies *P. purpurescens* y *P. sinaicum* Bor. Kn. (Zdero *et al.* 1991; el-Dahmy *et al.* 1994).



Ha sido descrita también la presencia de  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y fitol (Zdero *et al.* 1991; el-Dahmy *et al.* 1994).

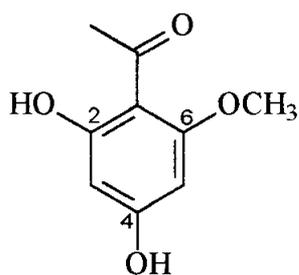


Fitol

 $\beta$ -Sitosterol

### II.2.3.5. Acetofenonas

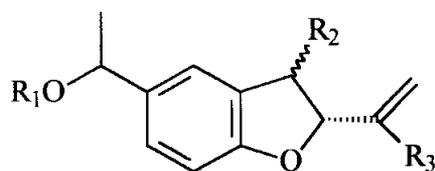
Zdero *et al.* (1991) identificaron la 2,4-dihidroxi-6-metoxi-acetofenona de la especie *P. purpurescens*.



2,4-Dihidroxi-6-metoxi-acetofenona

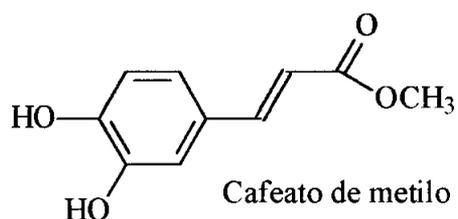
### II.2.3.6. Otros

Igualmente, Zdero *et al.* (1991) aislaron e identificaron derivados del leisseral a partir de la especie *P. purpurescens*.



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
Leisseral	H	H	CHO
Derivado 1	Angelato	$\alpha$ OAc	CHO
Derivado 2	Angelato	$\beta$ OAc	CHO
Derivado 3	Angelato	$\alpha$ OAc	COOCH <sub>3</sub>

Se ha descrito el aislamiento del derivado cafeico, cafeato de metilo, a partir de *P. purpurescens* (Zdero *et al.* 1991).



#### 2.2.4. USO POPULAR

Tanto las partes aéreas como la planta entera de la especie *Phagnalon rupestre* han sido empleadas en la medicina tradicional, ya en uso externo como anestésico para el dolor de muelas y para provocar quemaduras, ya en uso interno para combatir el dolor de cabeza y tratar el asma (Ali-Shtayeh *et al.* 1998; Friedman *et al.* 1986).

### 2.2.5. FARMACOLOGÍA

Pocos son los estudios sobre las actividades farmacológicas de los extractos o compuestos aislados de la especie *Phagnalon rupestre*, pudiéndose citar que Ali-Shtayeh *et al.* (1998) describieron la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos y etanólicos de *P. rupestre* frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Se han descrito propiedades farmacológicas para algunos de los compuestos mencionados anteriormente.

Así, Ghelardini *et al.* (2001), en un estudio sobre la actividad como anestésicos locales de los distintos componentes de los aceites esenciales de diversas especies, atribuyen al terpineol una notable actividad anestésica local, comparable en el experimento realizado, al anestésico clásico procaína. Estos autores justifican en parte el uso popular que se ha hecho de las especies de las que proviene, como antiespasmódicos y carminativos en alteraciones gastrointestinales.

Aunque la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los flavonoides es bien conocida, datos recientes describen los efectos de apigenina y luteolina (Hirano *et al.* 2001; Kong *et al.* 2001; Romanova *et al.* 2001; Xagorari *et al.* 2001). Apigenina inhibe además, la sobre-regulación *in vivo* de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF). Luteolina posee propiedades quimiopreventivas frente al cáncer así como efectos antiagregante plaquetarios (Kong *et al.* 2001). También han sido descritas las propiedades inhibitoras de la enzima xantina oxidasa de los flavonoides luteolina y apigenina (Cos *et al.* 1998; Kasai *et al.* 1999). Además, Cottiglia *et al.* (2001) evaluaron la actividad antimicrobiana de luteolina y apigenina-7-O-glucósido.

Para el triterpeno, ácido oleanólico, se han descrito propiedades antiinflamatorias en modelos de edema plantar en ratón y rata inducido por

carragenina, en artritis inducida por adyuvante y en modelos de hipersensibilidad retardada inducida por dinitroclorobenceno (revisado por Ríos *et al.* 2000). Este triterpeno es capaz de reducir el edema auricular inducido por 12-desoxiforbol-13-acetato (DPT), 12-desoxiforbol-13-fenilacetato (DPP) y briostatina 1 (Huguet *et al.* 2000). También se ha mencionado una actividad hepatoprotectora, mediada probablemente por la propiedad de este compuesto de aumentar la capacidad de regeneración del glutatión hepático (Yin *et al.* 2001).

El alcohol alifático de cadena larga, fitol, posee: actividad antimicobacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis* con unos valores de concentración mínima inhibitoria en el mismo rango que el fármaco etambutol (Rajab *et al.* 1998). También se han descrito propiedades antiinflamatorias de este compuesto en varios modelos experimentales *in vivo* de edema plantar inducido por distintos agentes, tales como carragenina, histamina y el compuesto 48/80 (Shimizu *et al.* 1990). El isoprenoide posee además propiedades antiespasmódicas, con potencia dentro del mismo rango que el fármaco antiespasmódico utilizado clínicamente, papaverina (Pongprayoon *et al.* 1992).

Respecto a los esteroides vegetales o fitosteroides, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol, han sido descritas propiedades antiinflamatorias tópicas y sistémicas (Gómez *et al.* 1999; Navarro *et al.* 2001), analgésicas (Gaertner *et al.* 1999; Santos *et al.* 1995), citostáticas (Gómez *et al.* 2001) y, en el caso de estigmasterol, actividad antiviral frente al virus Parainfluenza tipo 3 (Jian *et al.* 2001).

La cetona isoprenoide de 18 átomos de carbono, hexahidrofarnesilacetona, ha sido descrita como biológicamente activa inhibiendo la incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina en cultivos de células ováricas de crustáceos (Ferezou *et al.* 1977).

Respecto a la toxicidad, el compuesto 2-dimetilalil-1,4-benzoquinona, se ha considerado como un alergen de contacto con un poder sensibilizante de mediana fuerza (Hausen *et al.* 1977).

## **II.3. HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA**

### **II.3.1. INTRODUCCIÓN**

Atendiendo a la clasificación de Coombs y Gell, las reacciones de hipersensibilidad de tipo IV o retardada, abarcan todas aquellas reacciones de hipersensibilidad que tardan más de 12 horas en desarrollarse y en las que intervienen reacciones inmunitarias mediadas por células, en vez de humorales (Roitt 1993).

Se conocen tres tipos de reacciones de hipersensibilidad retardada. La hipersensibilidad por contacto y la de tipo tuberculínico ocurren en el plazo de 72 horas después del contacto con el antígeno, mientras que las reacciones granulomatosas tienen lugar en un periodo de semanas.

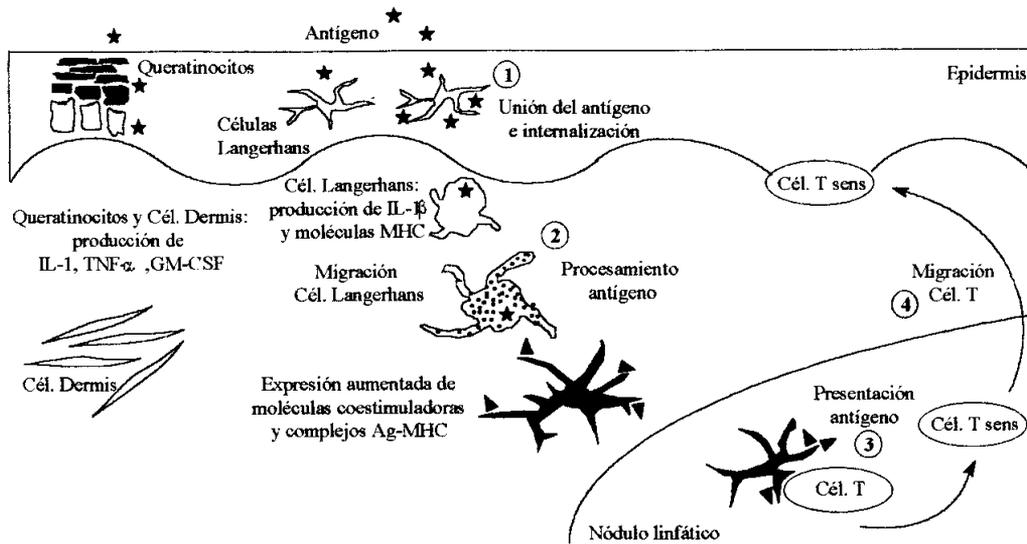
El conocimiento acerca de la hipersensibilidad por contacto afecta básicamente a la fase de sensibilización, conociéndose poco sobre la fase de desencadenamiento.

La hipersensibilidad por contacto (CHS) es una de las respuestas inmunes *in vivo* más estudiada debido al hecho de que se considera un prototipo de reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) mediada por células T. Muchos estudios sobre la fisiopatología de la CHS se han centrado en la fase de sensibilización, ya que es aquí cuando las células T son estimuladas y diferenciadas en células T efectoras o de memoria específicas de antígenos. En cambio, en la clínica la fase de sensibilización es habitualmente asintomática, mientras que la elicitación resulta en la manifestación de la dermatitis alérgica de contacto.

### **II.3.1.1. FASE DE SENSIBILIZACIÓN**

Tal como describe Grabbe y Schwarz (1998) la fase de sensibilización de la CHS comienza cuando el hapteno penetra a través de la piel y se combina con proteínas, siendo este conjugado el que es reconocido por células presentadoras de antígenos (APC), principalmente las células de Langerhans (LC) epidérmicas, las cuales migran hacia los nódulos linfáticos regionales, donde lo presentan a los linfocitos T (Fig. 1).

Las LC epidérmicas, de carácter dendrítico, residen en la piel normal en un estado funcional de “reposo” caracterizado por una alta capacidad endocitósica y procesadora de antígenos. La aplicación tópica de un hapteno induce la secreción de citocinas de queratinocitos (KC), LC y otros tipos celulares, que provoca la activación y migración de las LC, portando antígenos hacia los nódulos linfáticos regionales. Durante este proceso, las LC procesan el antígeno y adquieren un estado funcional “maduro”, que está asociado con la inducción de la secreción de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, quimiocinas), una alta expresión de moléculas de la superficie celular (moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II, moléculas de adhesión, moléculas coestimuladoras), y una alta capacidad de captura, procesamiento y presentación de antígenos. La activación y la inducción de la migración de las LC hacia los nódulos linfáticos parece depender de la capacidad que tienen los haptenos de inducir IL-1 $\beta$  en las LC, ya que este efecto casi inmediato tras la aplicación epicutánea del hapteno no es observado tras la aplicación de irritantes. Existen además otras citocinas que también contribuyen a la activación y migración de las LC, tales como quimiocinas, el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).



**Figura 1.** Descripción de la fase de sensibilización de CHS.

En el nódulo linfático, las LC establecen contacto con las células T, activándolas a través de la expresión de numerosas moléculas coestimuladoras, moléculas de adhesión y complejos de antígeno-MHC. Como resultado de la activación específica de antígeno, las células T sensibilizadas, alteran sus vías de migración y comienzan a recircular hacia los tejidos periféricos.

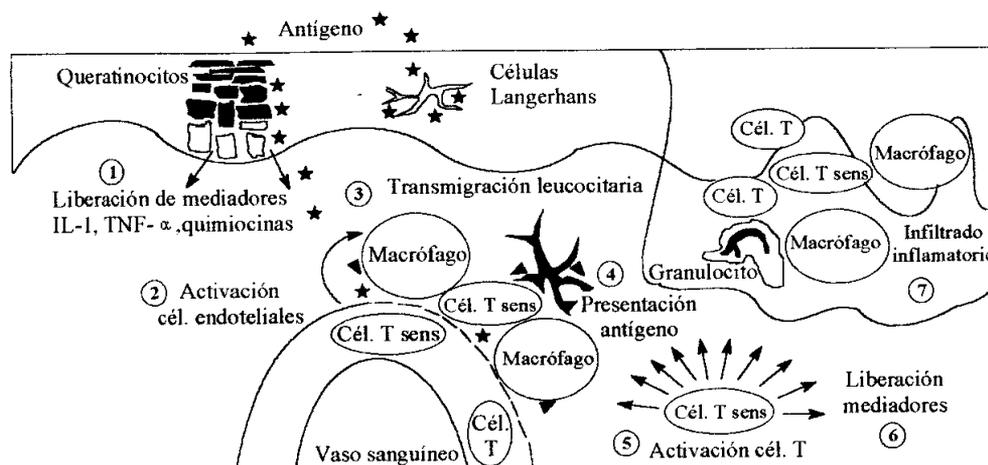
Hay muchos estudios que parecen indicar que aunque las LC son las principales APC que inducen células T efectoras, también células T inmunoreguladoras y/o células T supresoras pueden ser inducidas durante la aplicación epicutánea. No está claro aún la relevancia funcional de las células T efectoras y las supresoras en la CHS. Además, incluso la participación de los subtipos básicos de células T ( $CD4^+$  o  $CD8^+$ ) relevantes en el proceso de elicitación permanece confusa, debido en parte al hecho de que la dermatitis de contacto no se distingue de otras formas de respuesta de DHT, aunque existan algunas diferencias básicas que permiten hacerlo.

### **II.3.1.2. FASE DE DESENCADENAMIENTO**

Desde un punto de vista histopatológico, los primeros hallazgos en la respuesta de CHS son la desgranulación mastocitaria, vasodilatación y afluencia de neutrófilos, seguido posteriormente por células mononucleares y células T. Sin embargo, los acontecimientos fisiopatológicos producidos dependen claramente de las células T.

Aunque queda mucho por saber sobre cuáles son los mecanismos por los que se produce el desencadenamiento de la reacción de hipersensibilidad retardada tras el segundo contacto con el hapteno, existen hipótesis sobre cómo ocurre.

Tal como se muestra en la figura 2, el segundo contacto del hapteno produce los mismos efectos directos sobre la piel, que la primera aplicación del mismo en la fase de sensibilización, como son por ejemplo, los efectos proinflamatorios, la activación de las LC, etc. Mientras que la activación de las LC es el acontecimiento relevante durante la sensibilización, en el desencadenamiento los efectos proinflamatorios no específicos, como la inducción de la secreción de mediadores (histamina, serotonina y prostaglandinas) y citocinas (1, en la figura), la expresión de diversos tipos de moléculas (adhesión, coestimuladoras y del MHC) y la activación de células endoteliales (2) inicia el proceso de desencadenamiento de la reacción, debido probablemente a la atracción de leucocitos al sitio de aplicación del hapteno (3). Entre ellas están las células T sensibilizadas, que son activadas por la presentación del antígeno bien por células residentes o por la infiltración de células presentadoras de antígenos (4). La activación de las células T específicas de antígeno (5) induce la liberación de mediadores de éstas (6), que amplifica la respuesta generando un proceso inflamatorio que conduce a la posterior acumulación de células infiltradas (7), que resulta en la manifestación clínica de la dermatitis de contacto.



**Figura 2.** Descripción de la fase de desencadenamiento de CHS.

### II.3.1.3. DIFERENCIAS ENTRE CHS Y DTH

La CHS está mediada por células T  $CD4^+$  acopladas a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II. Sin embargo, aunque esto ocurra en la mayoría de las respuestas clásicas de DTH (como en las desencadenadas por la inyección subcutánea de eritrocitos de cordero), cada vez hay más evidencias de que las células T efectoras que median la CHS pertenecen al fenotipo  $CD8^+$ , mientras que las células  $CD4^+$  podrían tener efectos reguladores disminuyendo la respuesta de la reacción de hipersensibilidad. Por el contrario, la DTH es una respuesta desencadenada por células  $CD4^+$  con unos efectos aparentes de regulación de la reacción llevados a cabo por las células  $CD8^+$ . Es sabido que los patrones de respuesta pueden depender del antígeno usado, y parece posible que los haptenos evocan respuestas oligoclonales que pueden incluir células  $CD4^+$  y  $CD8^+$ .

Las células residentes en la zona de exposición del antígeno pueden contribuir a las diferencias existentes entre estas respuestas. Así, durante la

iniciación de la CHS los KC determinan con su patrón de liberación de citocinas el microambiente en el cual las APC son activadas tras la aplicación del hapteno, mientras que durante la DTH los macrófagos controlan el ambiente de citocinas tras la aplicación subcutánea del antígeno, ya que se ha comprobado que en ratones con una función defectuosa en los macrófagos no producen una DTH, pero sí tienen una respuesta normal de CHS.

### **II.3.2. ESPECIES VEGETALES Y PRINCIPIOS DE ORIGEN NATURAL ACTIVOS EN MODELOS DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA**

Son muchos los estudios sobre la actividad inmunomoduladora que se han realizado con extractos de especies vegetales. No obstante escasean aquellos sobre los compuestos de origen natural activos en reacciones de hipersensibilidad retardada.

Así, dentro de la familia Ranunculaceae, el extracto etanólico de la especie *Isopyrum thalictroides*, parece retrasar más que inhibir la reacción de hipersensibilidad retardada inducida por eritrocitos de cordero (SRBC) en un protocolo de pre-tratamiento, en el cual la administración del extracto es previa al desencadenamiento de la reacción (Ivanovska *et al.* 1996). El extracto hexánico de otra especie de esta familia, *Ranunculus sceleratus*, inhibe en un 50%, a las 48 h, la reacción de hipersensibilidad retardada inducida por oxazolona (Prieto 2001).

Existen diferentes resultados en la bibliografía acerca de la actividad del extracto metanólico de la especie *Withania somnifera* (Solanaceae) en el modelo de hipersensibilidad retardada inducida por SRBC. Así, Davis y Kuttan (2000) informaron sobre la inhibición de la reacción en un protocolo de pretratamiento, mientras que Agarwal *et al.* (1999) observaron el efecto contrario en el mismo modelo. Este último grupo destaca el efecto inmunomodulador al observar como el extracto es capaz de inhibir la

potenciada reacción de hipersensibilidad que tiene lugar tras la administración de ciclofosfamida.

Cuéllar *et al.* (1997), en un estudio sobre la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de la especie *Zanha africana* (Sapindaceae), a partir de la que se han aislado derivados triterpénicos de la serie oleanano, saponinas y ciclitoles, observaron la inhibición en un 25% de la reacción de hipersensibilidad retardada inducida por oxazolona.

El extracto alcaloídico de *Boerhaavia diffusa* (Nyctaginaceae) resultó activo en el modelo de hipersensibilidad retardada de tipo tuberculínico inducida por SRBC cuando fue administrado en la fase de inducción de la reacción, resultando inefectivo cuando se realizó en la fase de elicitación (Nungatiwar *et al.* 1999). Se ha observado que el extracto alcaloídico de las hojas de *Tylophora indica* (Asclepiadaceae) es capaz de inhibir tanto la reacción de hipersensibilidad retardada de tipo tuberculínico inducida por SRBC, como la hipersensibilidad por contacto inducida por dinitrofluorobenceno (Ganguly y Sainis 2001).

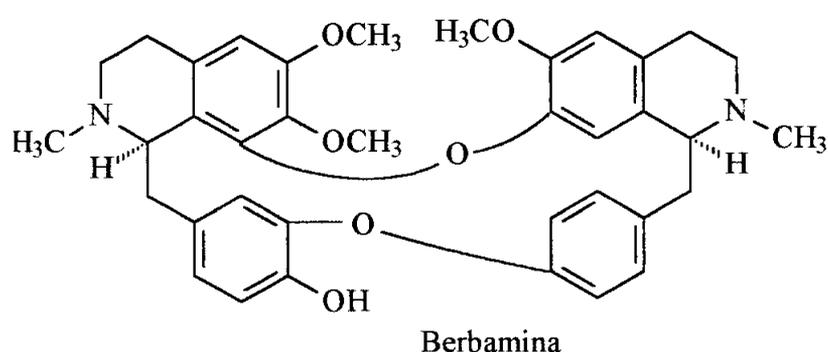
Estudios sobre las especies *Cedrela lilloi*, *Melia azedarach*, *Trichilia glabra* y *Trichilia elegans*, de la familia Meliaceae, revelaron que los correspondientes extractos acuosos vegetales eran activos en la fase de inducción de la reacción de hipersensibilidad retardada inducida por SRBC (Nores *et al.* 1997; Benencia *et al.* 2000).

El extracto metanólico de la especie *Helichrysum italicum* (Asteraceae) ha sido descrito como un débil inhibidor de la reacción de DTH inducida por SRBC, cuando se administró el extracto en la fase de elicitación de la misma (Sala 2001).

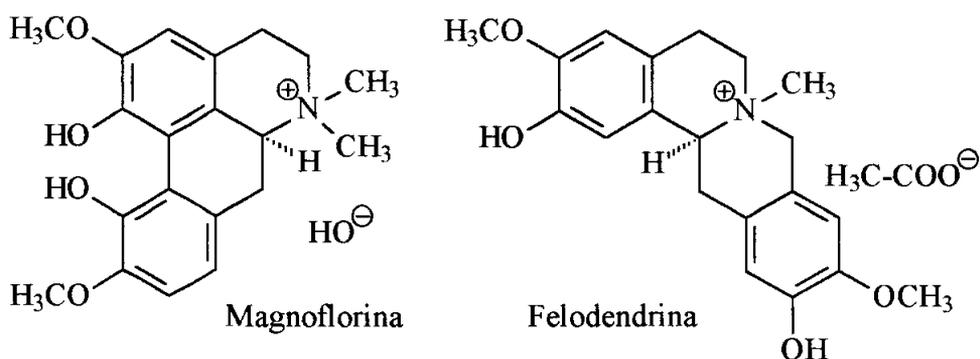
Cabe destacar que aunque muchos extractos vegetales han demostrado tener propiedades inmunomoduladoras, y más concretamente inmunodepresoras en modelos de hipersensibilidad retardada, resulta más bien

escasa la bibliografía acerca de la profundización sobre cuáles son los compuestos responsables de tales actividades.

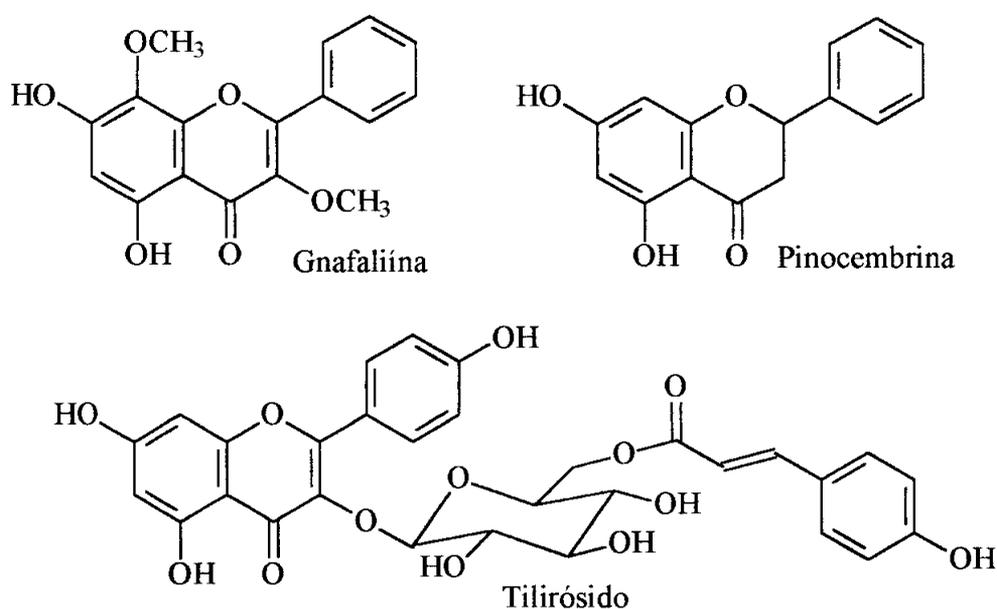
El alcaloide bisbencilisoquinoleínico berbamina manifestó un efecto inhibitor de la reacción de hipersensibilidad retardada inducida por SRBC, con un porcentaje de inhibición del 50% a la dosis de 50 mg/kg/día (Luo *et al.* 1998).



Mori *et al.* (1993 y 1994) estudiaron los alcaloides cuaternarios felodendrina y magnoflorina en modelos de hipersensibilidad retardada. Observaron que ambos alcaloides inhibían la fase de inducción de la reacción de tipo tuberculínica inducida por SRBC y la de contacto inducida por cloruro de picrilo en ratones, así como la inducida por tuberculina en cobayas.

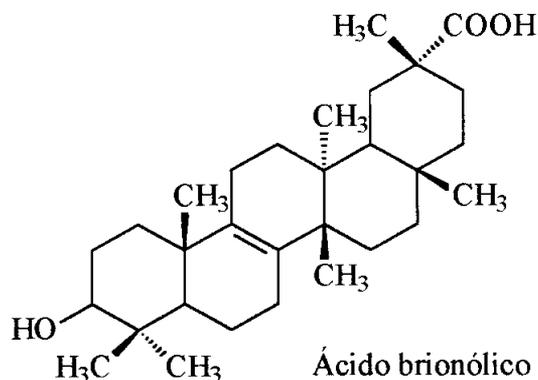


Ha sido también descrita la moderada capacidad inhibidora de la fase de elicitación de la reacción de hipersensibilidad retardada inducida por SRBC, manifestada por los flavonoides gnafaliína, pinocembrina y tilirósido (Sala 2001).



Compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza como el fitol y el  $\beta$ -sitosterol producen una inhibición ligera de la DTH inducida por oxazolona tanto a las 24 h como a las 72 h (Prieto 2001).

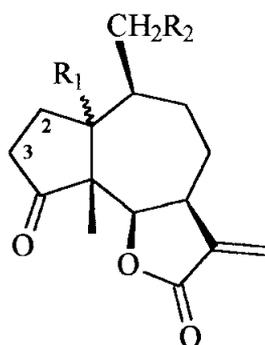
El ácido brionólico, un triterpeno pentacíclico aislado, entre otras especies, de *Luffa cylindrica* (Cucurbitaceae), causa una disminución del espesor auricular dosis dependiente en el modelo de hipersensibilidad por contacto inducida por cloruro de picrilo (Tanaka *et al.* 1991).



El triterpeno correolide y dos análogos del mismo, bloqueantes de los canales de potasio dependientes de voltaje Kvl.3, han mostrado propiedades inmunosupresoras, observándose la inhibición de la reacción de hipersensibilidad retardada frente a tuberculina (Koo *et al.* 1999).

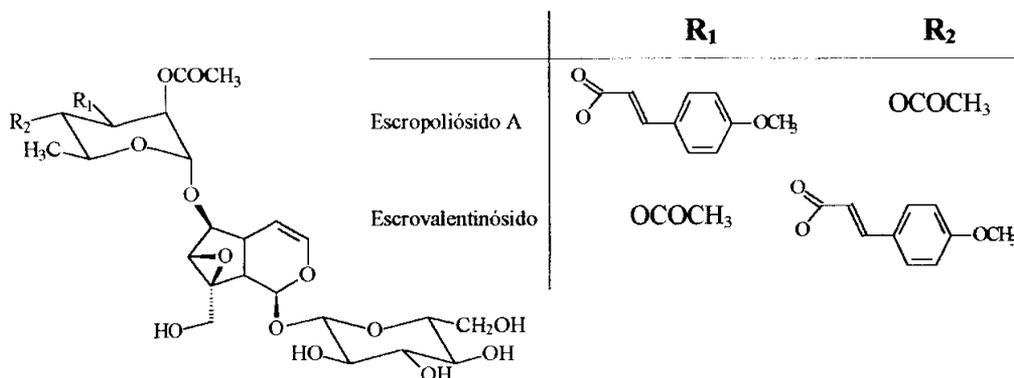
Wu *et al.* (2001) observaron la capacidad de la saponina, ruscogenina 1-O- $[\beta$ -D-glucopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)] $[\beta$ -D-xilopiranosil(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-fucopiranosido, de inhibir la reacción de hipersensibilidad retardada afectando a la formación de células T efectoras y de la acción inflamatoria, no produciendo el efecto secundario habitual de muchos compuestos inmunosupresores, como los glucocorticoides y agentes citotóxicos, de inhibición de órganos inmunes.

Dentro de las lactonas sesquiterpénicas, ampliamente distribuidas en especies de la familia Asteraceae, algunas de éstas con actividad antiinflamatoria debido a su contenido en esta clase de compuestos, Recio *et al.* (2000) observaron que dos lactonas sesquiterpénicas pseudoguaianólidos, tetraneurina A y partenina, eran ligeramente activas en el modelo de hipersensibilidad retardada inducida por oxazolona.



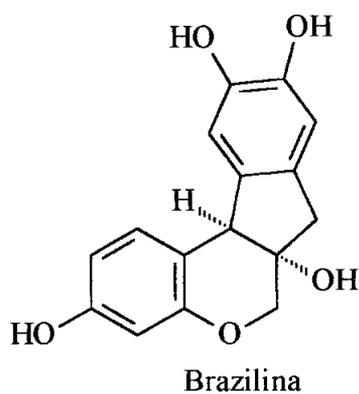
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
Tetraneurina A	$\alpha$ OH	OAc
Partenina	$\beta$ OH	H

En un estudio sobre la actividad antiinflamatoria de compuestos glucoterpenoides aislados de *Scrophularia auriculata*, Giner *et al.* (2000) comprobaron la capacidad que poseían dos iridoides isómeros, escropoliósido A y escrovalentinósido, de inhibir en diferente grado la reacción de hipersensibilidad retardada inducida por oxazolona.

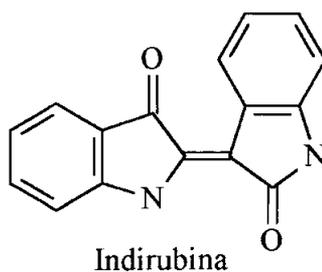


Brazilina, componente de la especie *Caesalpinia sappou* (Leguminosae), posee propiedades inmunomoduladoras ya que produce una disminución de la

reacción de hipersensibilidad retardada inducida por SRBC y aumentada por la administración del anestésico halotano (Choi y Moon 1997).



Kunikata *et al.* (2000) demostraron que el compuesto indirubina, aislado de la especie *Polygonum tinctorium*, inhibía tanto la reacción de hipersensibilidad retardada por contacto inducida por 2,4,6-trinitro-1-clorobenceno, como la producción de la citocina inflamatoria IFN- $\gamma$ , que juega un papel clave en dicha reacción.

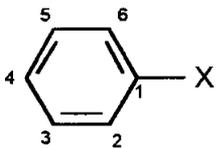


## II.4. DERIVADOS CAFEICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

### II.4.1. INTRODUCCIÓN

Los flavonoides y los ácidos fenólicos están universalmente distribuidos en la naturaleza. Los primeros engloban principalmente a catequinas, proantocianidinas y glucósidos de flavonas, flavonoles y antocianidinas, mientras que los compuestos ácidos fenólicos se encuentran, en general, como ácidos hidroxicinámicos o hidroxibenzoicos.

A continuación se muestra de forma esquemática la nomenclatura de ácidos benzoicos y cinámicos:

		
X: COOH		X: CH=CH-COOH
Ácido benzoico		Ácido cinámico
Ácido salicílico	2-OH	Ácido <i>o</i> -cumárico
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	4-OH	Ácido <i>p</i> -cumárico
Ácido vanílico	3-OCH <sub>3</sub> , 4-OH	Ácido ferúlico
Ácido siringico	3,5-di-OCH <sub>3</sub> , 4-OH	Ácido sinápico
Ácido protocatéquico	3,4-di-OH	Ácido cafeico
Ácido gentísico	2,5-di-OH	
Ácido gálico	3,4,5-tri-OH	

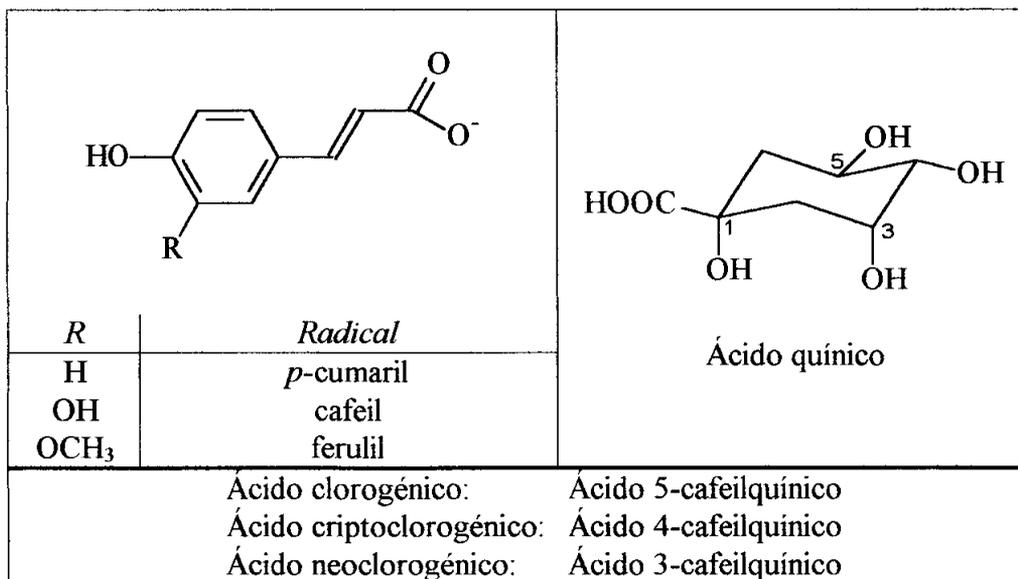
Los compuestos fenólicos de origen natural han sido objeto de un gran número de estudios químicos, biológicos, agrícolas y médicos, los cuales están extensamente tratados por la literatura científica.

En particular nos centraremos en los compuestos del ácido hidroxicinámico. Estos y sus derivados pueden existir tanto en la forma *Z* (*cis*)

como en la E (*trans*) según la geometría del doble enlace de la cadena lateral y, aunque parece evidente que todas las formas naturales son E (*trans*), durante el proceso de extracción ocurre inevitablemente la isomerización, extrayéndose frecuentemente la mezcla de isómeros.

Los compuestos ácidos hidroxicinámicos derivan casi exclusivamente de los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico, mientras que el sinápico es comparativamente poco común.

Normalmente los ácidos hidroxicinámicos más habituales no están presentes en la naturaleza en un estado libre, sino que aparecen más frecuentemente esterificados con la glucosa o con el ácido quínico. Respecto a estos últimos, los compuestos más frecuentes son los dos ácidos monocateilquínicos, ácido clorogénico y neoclorogénico.



Tras las recomendaciones de la IUPAC, la nomenclatura de isómeros de ácidos quínicos se vuelve un tanto confusa en la literatura.

En la nomenclatura de la IUPAC, el ácido quínico es tratado como ciclitol. En la configuración preferida, el grupo carboxilo y los grupos

hidroxilo de C-4 y C-5 son ecuatoriales, mientras que los grupos hidroxilo C-1 y C-3 son axiales. En el sistema IUPAC, los antiguos ácidos quínicos 3-*O*-acil son llamados ahora como 5-*O*-compuestos, y los antiguos ácidos quínicos 5-*O*-acil como 3-*O*-compuestos. Así, por ejemplo, el ácido clorogénico (antiguo ácido 3-*O*-cafeilquínico) ahora se corresponde con el ácido 5-cafeilquínico (Herrman *et al.* 1989).

Antes de profundizar en la bibliografía sobre la actividad antioxidante de los derivados cafeicos y más concretamente de los ácidos cafeilquínicos, conviene formarse una idea sobre las especies reactivas del oxígeno, así como de su implicación en diversos procesos fisiopatológicos.

#### **II.4.2. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO**

El oxígeno es esencial para la vida de organismos aeróbicos. Este juega un papel vital como aceptor terminal de electrones durante la respiración, aunque debido a su naturaleza biradical, el oxígeno y sus metabolitos son potencialmente tóxicos. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) constituyen un grupo que incluye tanto radicales ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{NO}\cdot$  y  $\text{O}_2\cdot^-$ ) como no radicales ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{ONOO}\cdot$ ). Las especies que contienen nitrógeno se suelen denominar alternativamente como RNS.

Los radicales libres son especies químicas que tienen un único electrón desapareado en una órbita externa. Esta situación le confiere una extremada inestabilidad y reactividad, con lo que reacciona con sustancias químicas tanto inorgánicas como orgánicas (proteínas, lípidos, carbohidratos), y en especial con moléculas clave de las membranas y con ácidos nucleicos. Además, los radicales libres permiten iniciar reacciones autocatalíticas, por lo que las moléculas con las que reaccionan se convierten ellas mismas en radicales libres capaces de propagar la cadena de lesión.

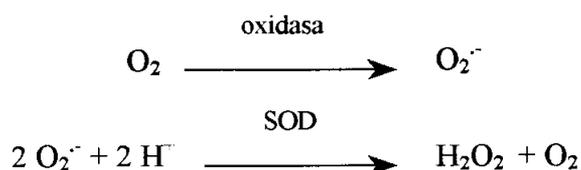
El electrón desapareado puede asociarse casi con cualquier átomo, pero los radicales libres basados en el oxígeno, carbono y nitrógeno son los de mayor importancia biológica.

#### II.4.2.1. ESPECIES REACTIVAS MÁS IMPORTANTES

Centrándonos en las ROS, las tres especies más importantes son el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Estos pueden producirse por la actividad de una variedad de enzimas oxidativas, en diferentes sitios de la célula (citosol, mitocondrias, lisosomas, peroxisomas y membrana plasmática).

##### II.4.2.1.1. FUENTES

Las fuentes de radical superóxido son: la mitocondria, xantina oxidasa tras su transformación proteolítica u oxidativa de xantina deshidrogenasa, o la NADPH oxidasa tras la activación de diferentes tipos celulares tales como leucocitos (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos), células endoteliales, fibroblastos y otros. Una vez producido, el  $O_2^{\cdot-}$  puede inactivarse de forma espontánea o, con mayor rapidez, dismutarse formando  $H_2O_2$ , a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD).



El peróxido de hidrógeno, a su vez, puede ser monovalentemente reducido por una sustancia donante de electrones ( $Xe$ , e: un electrón), dando lugar a la formación del radical hidroxilo.



La reacción (2) es conocida como reacción de Fenton.

El  $\text{Fe}^{3+}$ , a su vez, puede ser reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  por el anión superóxido:

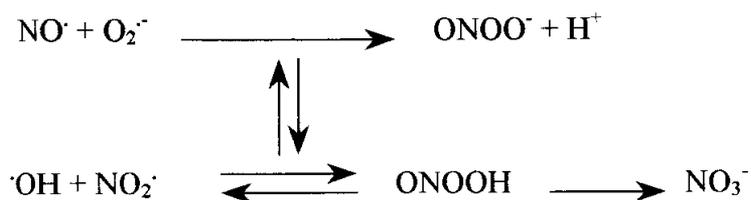


La suma de las reacciones (2) y (3) es conocida como el ciclo de Haber-Weiss:



La producción de especies reactivas del oxígeno catalizadas por metales de transición parece jugar un papel central en la lesión tóxica por oxígeno, donde el reciclaje del hierro ( $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$ ), del cobre ( $\text{Cu}^+ \leftrightarrow \text{Cu}^{2+}$ ) y, en ciertas reacciones, también del manganeso ( $\text{Mn}^{2+} \leftrightarrow \text{Mn}^{3+}$ ) pueden estar implicados. El hierro es sin duda el más abundante e importante catalizador en la formación de ROS (Hippeli *et al.* 1999).

El óxido nítrico (NO), un mediador químico importante, puede actuar como radical libre y puede ser convertido a un anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) altamente reactivo, además de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ .



#### II.4.2.1.2. REACCIONES CON COMPONENTES CELULARES

Estas especies reactivas pueden reaccionar en el organismo con diversos componentes del mismo, produciendo una serie de modificaciones que muchas veces resultan dañinas. Entre ellas se pueden destacar:

##### A. Peroxidación de los lípidos:

Esta es un conjunto de reacciones en cadena mediada por radicales libres que causa la degradación de los lípidos, siendo particularmente importante su acción a nivel de las membranas celulares. La peroxidación se puede iniciar por mecanismos de tipo no enzimático (radiaciones, catalizado por metales) o catalizado por enzimas. En ambos casos, la peroxidación lipídica se inicia por el ataque de un radical libre sobre un ácido graso poliinsaturado (AGPI). Los dobles enlaces son vulnerables al ataque de radicales libres derivados del oxígeno, en particular del  $\cdot\text{OH}$ . El radical “arranca” un átomo de hidrógeno al ácido graso poliinsaturado convirtiéndolo en un radical ácido graso (AGPI $\cdot$ ), que sufre una reorganización formándose un dieno conjugado, que rápidamente reacciona con oxígeno para formar el radical lipoperoxilo (AGPIOO $\cdot$ ). Este radical puede atacar a otros ácidos grasos formándose hidroperóxidos lipídicos (AGPIOOH) y nuevos radicales libres, propagándose el proceso. La presencia de trazas de iones metálicos cataliza la ruptura de éstos, originando un gran número de productos secundarios, entre ellos los radicales alcoxilos. Los productos finales de la peroxidación lipídica son muy variados (alcanos, alquenes, hidroxialquenes, malondialdehído (MDA), epóxidos de ácidos grasos, etc), algunos de los cuales contribuyen también al daño celular, inhibiendo por ejemplo, la síntesis proteica, bloqueando la acción de los macrófagos y produciendo cambios en la actividad enzimática. El efecto global es una disminución en la fluidez de la membrana y una desestabilización de los

receptores presentes en ella (Winrow *et al.* 1993). Este proceso se relaciona con numerosas alteraciones patológicas como procesos inflamatorios, toxicidad hepática causada por xenobióticos, trastornos vasculares y envejecimiento.

#### B. Modificación oxidativa de las proteínas:

Los radicales libres promueven tanto la formación de enlaces cruzados a través de los grupos sulfhidrilos de aminoácidos débiles como cisteína, histidina, lisina y metionina, como la fragmentación de las cadenas polipeptídicas. La modificación oxidativa puede llegar a ocasionar graves consecuencias a la célula, debido a que aquella fomenta la degradación de enzimas importantes por proteasas neutras citosólicas (Cotran 1998).

#### C. Lesiones en el ácido desoxirribonucleico (ADN):

La lesión puede afectar tanto al ADN nuclear como mitocondrial. En el primero, las reacciones de los radicales libres con bases como timina causan roturas en la hebra simple, llegándose a implicar dicha lesión tanto en la muerte celular como en la transformación maligna de las células (Cotran 1998).

### **II.4.2.2. SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE**

Frente a toda esta presencia de sustancias reactivas, el organismo cuenta con una serie de sistemas, tanto enzimáticos como no enzimáticos, que contribuyen a la terminación o inactivación de las reacciones de los radicales libres. Dentro de los primeros se encuentran: Superóxido dismutasa (que convierte el

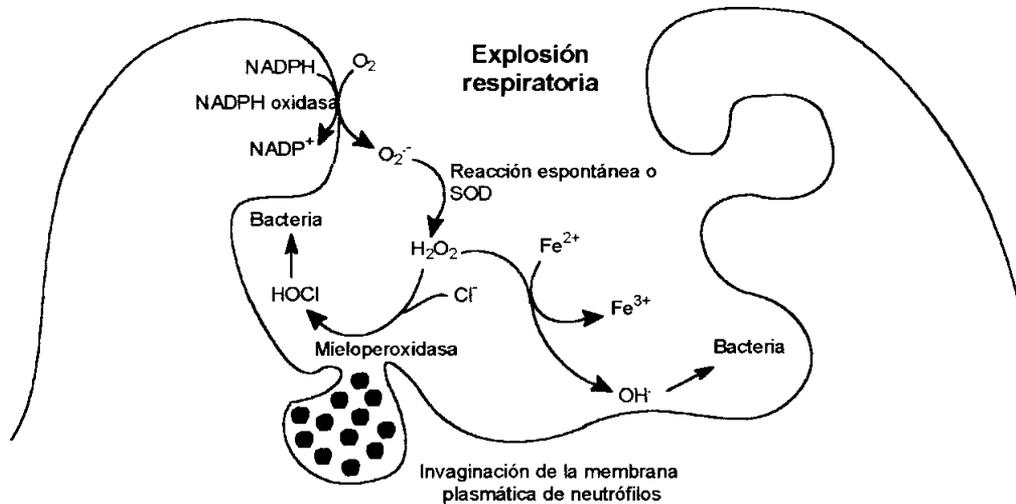
superóxido en  $H_2O_2$ ), Catalasa (presente en los peroxisomas, que descompone el  $H_2O_2$  en  $O_2$  y  $H_2O$ ) y los distintos isoenzimas de la Glutación peroxidasa (que cataliza la capacidad del glutatión reducido (GSH) para liberar el hidrógeno del  $-SH$  a un radical hidroxilo o al  $H_2O_2$ ). Y entre los no enzimáticos destacan: Vitamina A, vitamina C, carotenos, polifenoles, etc.

En muchos procesos patológicos, los efectos finales inducidos por los radicales libres dependen del balance neto entre la formación y la terminación de los mismos.

#### **II.4.2.3. PAPEL FISIOLÓGICO Y FISIOPATOLÓGICO DE LAS ROS**

Son numerosas las investigaciones acerca de la participación de esta serie de sustancias en procesos patológicos, así como del estudio del mecanismo de acción a través del cual se encuentran implicadas en ellas.

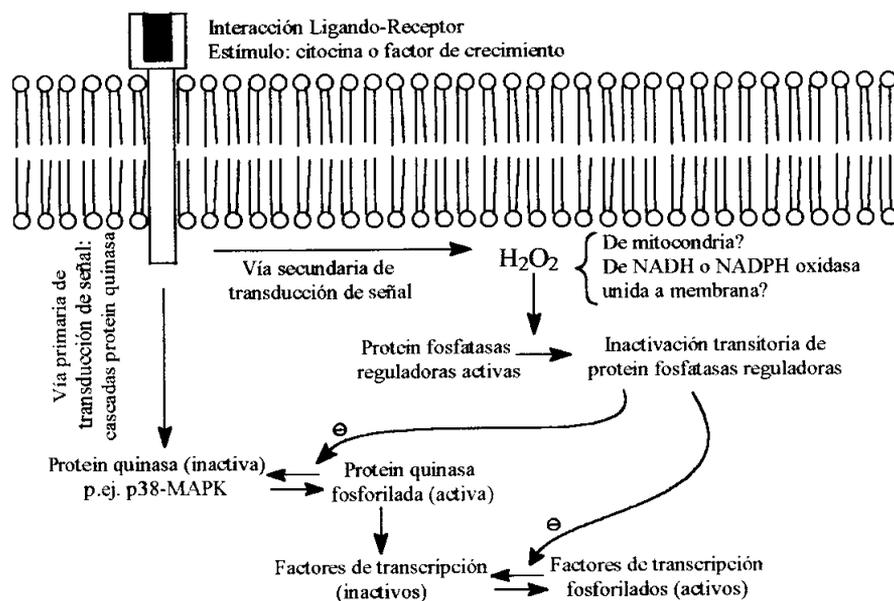
Dentro del proceso inflamatorio, en el que este constituye una respuesta de carácter protector cuyo objetivo último es aislar y librar al organismo de la causa inicial, las especies reactivas del oxígeno desempeñan un papel decisivo. Así, como es bien conocido desde hace tiempo y está ampliamente descrito en la bibliografía, la destrucción de las bacterias que se produce en la fagocitosis, se consigue principalmente por mecanismos dependientes del oxígeno (Fig. 3). La fagocitosis estimula un fuerte incremento en el consumo de oxígeno (“estrés oxidativo”), la glucogenolisis, el aumento en la oxidación de la glucosa a través de la derivación hexosa-monofosfato, y la producción de metabolitos activos reactivos del oxígeno. Estos se deben a la activación rápida de una oxidasa (NADPH oxidasa) que oxida al NADPH y reduce el oxígeno a ión superóxido.



**Figura 3.** Participación de ROS en el sistema de defensa antibacteriano mediado por neutrófilos.

Posteriormente, el superóxido se convierte en  $H_2O_2$ , sobre todo mediante dismutación espontánea. Las cantidades de  $H_2O_2$  que se producen en el fagolisosoma son insuficientes para ejercer el efecto destructor sobre la bacteria. Sin embargo, los gránulos azurófilos de los neutrófilos contienen la enzima mieloperoxidasa (MPO) que, en presencia de un haluro como el  $Cl^-$ , convierte el  $H_2O_2$  en  $HOCl$ , que es un potente agente antimicrobiano que destruye las bacterias mediante halogenación o mediante oxidación de las proteínas y lípidos. La mayor parte del  $H_2O_2$  es metabolizado finalmente por la catalasa en  $H_2O$  y  $O_2$ , mientras que una pequeña parte del mismo es destruido por la acción de la glutatión oxidasa. Pese a la eliminación del  $H_2O_2$  mencionada anteriormente, parte de esta especie en presencia de  $Fe^{2+}$  puede formar el radical altamente reactivo  $OH^\cdot$ , responsable también de procesos nocivos para la bacteria, tales como el de peroxidación lipídica (Winrow *et al.* 1993).

En la actualidad va aumentando el número de investigaciones que implican a especies reactivas del oxígeno como componentes importantes dentro de los procesos de transducción de la señal celular. Se ha visto que el  $H_2O_2$  es producido en ciertos tipos celulares como respuesta a la activación por citocinas ( $IL-1\beta$ ) y factores de crecimiento (PDGF, EGF), y que actúa como segundo mensajero estimulando cascadas de protein quinasas acopladas a la expresión génica de mediadores inflamatorios o al control del ciclo celular. Así, se ha citado como probable función del  $H_2O_2$  la inactivación de enzimas fosfatasa con un papel regulador de dichas vías de transducción de la señal (Fig. 4). Por ello, una de estas vías que implica a la protein quinasa activada por mitógeno (p38 MAPK) que regula la expresión de citocinas inflamatorias como la  $IL-1\beta$  y la expresión de iNOS y COX-2, constituye una buena diana para el antagonismo antioxidante en enfermedades inflamatorias crónicas (Hensley *et al.* 2000).



**Figura 4.** ROS en procesos de transducción de la señal celular.

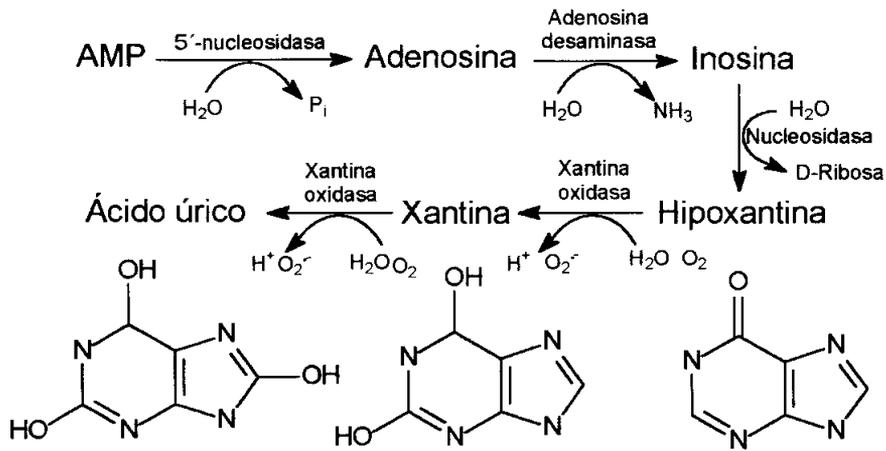
Es conocido el importante papel que desempeña la PKC en el proceso de transducción de la señal en la célula. Esta enzima cuenta con características estructurales únicas que la hacen susceptible de sufrir modificaciones oxidativas. Así, el dominio regulador N-terminal contiene motivos ricos en cisteínas, que son fácilmente oxidados por peróxidos. Tras dicha oxidación la función autoinhibidora se ve comprometida y, en consecuencia, es estimulada la actividad celular de la PKC. Por otro lado, el dominio catalítico C-terminal contiene varias cisteínas reactivas que son el blanco para antioxidantes como selenocompuestos, agentes polifenólicos y análogos de la vitamina E. La modificación de dichas cisteínas disminuye la actividad celular de la PKC. Por tanto, los dos dominios de la PKC responden de diferente manera frente a dos tipos distintos de agentes: los oxidantes reaccionan selectivamente con el dominio regulador, estimulando la vía de la PKC celular, mientras que los agentes antioxidantes reaccionan con el dominio catalítico inhibiendo la actividad de la PKC celular (Gopalakrishna y Jaken 2000).

Las especies reactivas del oxígeno han sido implicadas en el mantenimiento de una alta expresión de ciertos receptores de quimiocinas y en la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B, importante en el proceso inflamatorio ya que controla la transcripción de genes de citocinas tales como IL-2 y TNF- $\alpha$ , así como el gen del receptor para la IL-2 y genes del MHC de clase I (Winrow *et al.* 1993; Lentsch y Ward 1999; Saccani *et al.* 2000; Tak y Firestein 2001).

En procesos de isquemia-reperfusión, como ocurre en la artritis reumatoide, también se ha visto la implicación de especies reactivas del oxígeno. Así, en la fase de isquemia la fosforilación oxidativa cesa y la producción de ATP se vuelve dependiente de la glucólisis anaeróbica con la concomitante producción de lactato. Altos niveles de éste, junto con un incremento en la proporción de NADH frente a NAD<sup>+</sup> causa inhibición de la

glucolisis. Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se elevan, mientras que los de ATP y ADP disminuyen, produciéndose una acumulación de adenosina y de sus productos de degradación, xantina e hipoxantina. Estos son sustratos para la xantina oxidoreductasa que, en condiciones de isquemia se convierte a la forma oxidada y, en la reperusión, genera radicales superóxidos los cuales pueden dismutar a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Si a esto se añade que en la sinovial de pacientes con artritis reumatoide se producen microhemorragias y que existen depósitos de hierro en forma de ferritina, en condiciones de hipoxia y acidosis se puede ceder el hierro de estos depósitos, estimulando la formación de  $\cdot\text{OH}$ , contribuyendo a amplificar el daño existente (Winrow *et al.* 1993).

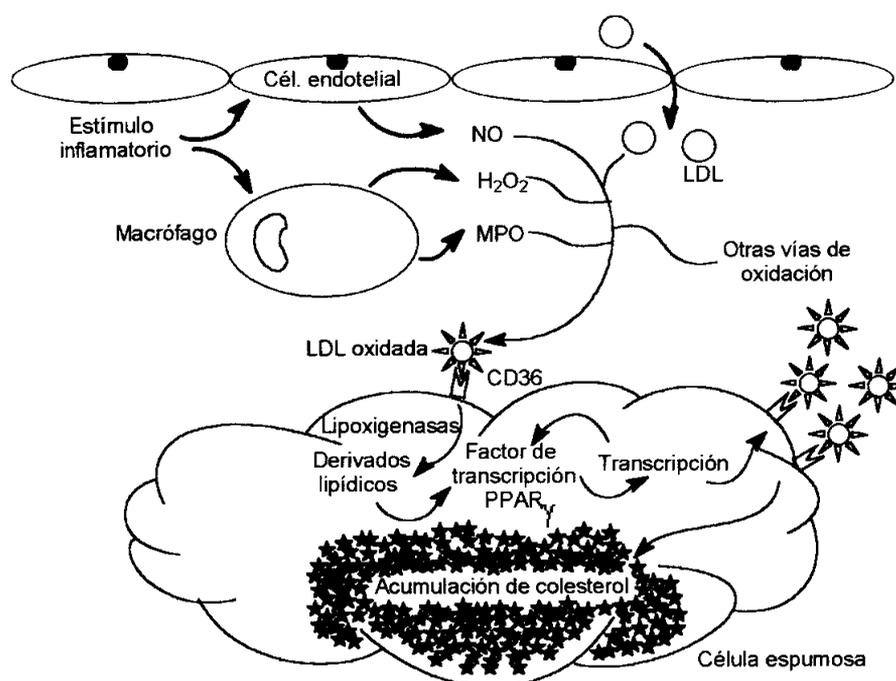
Importante resulta la enzima anteriormente citada, xantina oxidasa (XO), ya que no sólo conduce a la producción de radicales superóxido, sino que al ser una enzima clave en la vía de formación de ácido úrico a partir de hipoxantina y xantina, una inhibición de dicha enzima causaría una disminución en la formación de dicho metabolito (Fig. 5). Inhibidores selectivos de XO podrían ser, por tanto, agentes útiles en el tratamiento de la hiperuricemia y la gota. A este respecto, para el tratamiento de la hiperuricemia los fármacos existentes pertenecen a dos grupos distintos: los uricosúricos y los inhibidores de la xantina oxidasa-xantina deshidrogenasa, siendo el alopurinol el único fármaco comercializado para este último grupo. Aunque se han encontrado compuestos con efectos incluso más potentes que él, ninguno es usado de forma habitual para el tratamiento de la hiperuricemia (Osada *et al.* 1993), haciendo muy interesante la búsqueda de nuevos y mejores inhibidores enzimáticos.



**Figura 5.** Participación de ROS y xantina oxidasa en el catabolismo de purinas.

Importante resulta también el papel que desempeñan tanto las especies reactivas de oxígeno como las de nitrógeno, en las patologías cardiovasculares. A este respecto, se ha demostrado la activación y/o inducción de oxidasas citosólicas, tales como NADH/NADPH oxidasa, XO, e isoformas de la óxido nítrico sintasa, en determinadas condiciones de estrés fisiológico. Al igual que en el proceso patológico de artritis reumatoide, la enzima XO juega también un papel clave en la enfermedad cardiovascular. Así, un exceso de producción de ROS, durante una hipoxia crónica o ante la incrementada presencia de citocinas inflamatorias, puede aumentar la actividad de la enzima y su liberación al plasma. Existen estudios en los que relacionan altos niveles de XO circulante con procesos de hipercolesterolemia y aterosclerosis (Wattanapitayakul y Bauer 2001). También ha sido descrita la participación de las especies reactivas del oxígeno en el proceso de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estas lipoproteínas oxidadas (ox-LDL) actúan como quimiotácticos para monocitos circulantes y tóxicos para las células endoteliales (Fig. 6). Posteriormente, tras atravesar la pared vascular los monocitos son diferenciados a macrófagos, los cuales son capaces de reconocer a las ox-LDL

e incorporarlas al interior celular, resultando finalmente en la formación de células espumosas, primera fase del establecimiento de una lesión aterosclerótica (Wattanapitayakul y Bauer 2001; Febbraio *et al.* 2001).



**Figura 6.** Oxidación de lipoproteínas de baja densidad y su implicación en la formación de células espumosas.

#### II.4.3. DERIVADOS CAFEICOS

Aunque existe una gran cantidad de evidencias de los efectos beneficiosos relacionados con las propiedades antioxidantes de los flavonoides, y aunque menos, también del ácido cafeico, existen pocos estudios sobre dichas propiedades de los derivados cafeilquínicos.

#### II.4.3.1. ÁCIDOS CAFEICO Y CLOROGÉNICO COMO ANTIOXIDANTES

Existen trabajos en los que se muestra la actividad antioxidante del ácido cafeico, actuando este como un inhibidor de la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) inducida por peroxinitritos y cobre (Morton *et al.* 2000; Chalas *et al.* 2001). También se muestra activo en modelos de inducción de estrés oxidativo en monocitos humanos por administración de *tert*-butilhidroperóxido (*t*-BuOOH) (Nardini *et al.* 1998; Fraga *et al.* 1987).

Cartron *et al.* (2001) y Meyer *et al.* (1998) estudiaron tanto el ácido cafeico, como el derivado ácido 5-cafeilquínico (ácido clorogénico), viéndose que ambos inhibían la oxidación de la lipoproteína LDL inducida tanto por  $\text{Cu}^{2+}$  como por 2,2'-azobis[2-amidinopropano] (AAPH).

Si parece bien establecido que el ácido cafeico y el ácido clorogénico inhiben la oxidación de LDL inducida por  $\text{Cu}^{2+}$ , Yamanaka *et al.* (1997) observaron que, dentro de las tres fases establecidas en la reacción en cadena radicalaria, tales como la de iniciación, propagación y terminación, los efectos antioxidantes se producían únicamente en la fase de iniciación, reduciéndose conforme se produce la transición a la fase de propagación donde la inhibición decae hasta ser abolida, para finalmente ser aumentada la oxidación de LDL en la fase de propagación. Así, estos compuestos llegan a ejercer actividades prooxidantes en el transcurso de reacciones en cadena provocadas por radicales libres, tal y como se produce en el proceso de peroxidación lipídica. Podría ser que, dependiendo del estado redox, estos compuestos fenólicos, formaran productos de oxidación reactivos tales como semiquinonas y quinonas, comportándose como estimuladores de reacciones oxidativas.

En un estudio global que incluía la evaluación de la actividad captadora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), la actividad antioxidante en el modelo generador de radical superóxido a través del sistema xantina-xantina oxidasa, la actividad inhibidora de la peroxidación del ácido linoleico, y la

actividad inhibidora tanto de la peroxidación como de la lisis de eritrocitos inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tanto el ácido cafeico como el clorogénico resultaron activos (Ohnishi *et al.* 1998).

Se ha descrito también el posible papel fotoprotector de la piel de algunos compuestos fenólicos, entre ellos el ácido cafeico y el ácido clorogénico, ya que estos compuestos resultaron activos en el ensayo de la degradación de colágeno inducida por radicales libres, situación que simula parte de las consecuencias de los efectos tóxicos causados en la piel por la radiación ultravioleta (Facino *et al.* 1995).

#### II.4.3.2. DERIVADOS DICAFFEILQUÍNICOS COMO ANTIOXIDANTES

Existen algunos datos bibliográficos acerca de la actividad antioxidante de los compuestos dicafeilquínicos. Así, dentro de este tipo de compuestos, Heilmann *et al.* (1995) observaron las propiedades del ácido 1,5-di-*O*-cafeilquínico como captador de radical, tras producir una inhibición de la quimioluminiscencia tanto en neutrófilos estimulados con el péptido fMLP y con el polisacárido zimosán, como en un modelo no celular con el sistema peroxidasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Según los estudios realizados por Azuma *et al.* (1999) el ácido 3,5-di-*O*-cafeilquínico resultó tener una actividad antioxidante en modelos de peroxidación del ácido linoleico mayor que, tanto el compuesto monosustituido ácido clorogénico, como el ácido cafeico.

El compuesto ácido 3,4-di-*O*-cafeilquínico ha sido también evaluado frente a su actividad antioxidante en modelos basados en la medida tanto *in vitro* como *in situ* de la quimioluminiscencia, tras la adición de *t*-BuOOH a homogenados de hígado de ratón en el primer caso, o tras la administración de

CCl<sub>4</sub> en el segundo, observándose tan sólo una moderada actividad (IC<sub>50</sub>: 20 µM) antioxidante en este último modelo (Fraga *et al.* 1987).

En otros modelos de peroxidación lipídica tanto en mitocondria inducida por adenosina 5'-difosfato (ADP) y ácido ascórbico, como en microsomas inducida por ADP y NADPH, se ha visto que los derivados ácido 3,4- 3,5- y 4,5-di-*O*-cafeilquinico inhibían a 10 µM alrededor de un 65% la peroxidación lipídica en el primer modelo, siendo mayores los efectos en el segundo modelo. En ambos los ácidos cafeico y clorogénico presentaban una menor actividad antioxidante, con valores de 17% de inhibición (Kimura *et al.* 1984).

Por otro lado, utilizando monocitos (componentes muy importantes en las reacciones de sensibilidad retardada, así como también en la inflamación) como substrato celular, Peluso *et al.* (1995) observaron que el ácido 3,5-di-*O*-cafeilquinico y el ácido 4,5-di-*O*-cafeilquinico inhibían tanto la quimiotaxis *in vitro*, como la activación de la producción de radical superóxido inducidos por zimosán.

Finalmente, como inhibidores de la enzima xantina oxidasa no se encuentran datos en la bibliografía acerca de los derivados dicafeilquinicos. Únicamente Hatano *et al.* (1990) evaluaron el ácido 3,5-di-*O*-cafeilquinico frente al sistema xantina-xantina oxidasa, con medición de la formación de ácido úrico, observando una actividad inhibidora de la enzima con una IC<sub>50</sub> de 34 µM.

#### II.4.3.3. OTRAS ACTIVIDADES DE DERIVADOS DICAFEILQUÍNICOS

Aparte de las nombradas propiedades antioxidantes de los derivados dicafeilquinicos, existen estudios sobre el metabolismo del ácido araquidónico. Así, Kimura *et al.* (1987) informaron sobre la capacidad de los ácidos 3,4- 3,5- y 4,5-di-*O*-cafeilquinico de inhibir la producción de LTB<sub>4</sub> y 5-HETE

(productos de la vía de la enzima 5-lipoxigenasa), sin inhibir la formación de PGE<sub>2</sub>. Este último hecho sería probablemente debido al poder antioxidante de estos compuestos que impedirían la inactivación de la enzima ciclooxigenasa por captación de los radicales del oxígeno responsables de dicha inactivación.

Igualmente, los tres dicafeilquinicos mencionados anteriormente causan la inhibición de la liberación *in vitro* de histamina de mastocitos peritoneales de rata (Kimura *et al.* 1985).

También se han citado propiedades hepatoprotectoras de este tipo de compuestos. Basnet *et al.* (1996) comprobaron dicha actividad para los ácidos 3,4- y 3,5-di-*O*-cafeilquinico y los ésteres metílicos de derivados dicafeilquinicos, tales como el 3,4-di-*O*-cafeil-metilquinato y el 4,5-di-*O*-cafeil-metilquinato, ejerciendo estos una acción hepatoprotectora más potente que la glicirricina a una concentración de 10 µg/mL.

Existen también datos sobre el papel de varios dicafeilquinicos sobre la actividad inmunomoduladora de células mononucleares humanas. En este sentido Lin *et al.* (1999) estudiaron los ácidos 3,4- 3,5- y 4,5-di-*O*-cafeilquinicos así como los ésteres metílicos del ácido 3,5-di-*O*-cafeilquinico y etílicos del 4,5-di-*O*-cafeilquinico, sobre un modelo de proliferación de células mononucleares humanas y de producción de interferón-γ. De todos ellos solo el ácido 3,4-di-*O*-cafeilquinico era un agente inmunomodulador, ejerciendo una actividad mitogénica.

Finalmente, Kwon *et al.* (2000) han descrito las propiedades antivirales de los ácidos 3,5- y 4,5-di-*O*-cafeilquinicos y, desde un punto de vista más fitoquímico, Kodoma *et al.* (1998) identificaron al ácido 3,5-di-*O*-cafeilquinico como un factor inhibidor de la infección frente a esporas patógenas de *Alternaria alternata*.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### III.1. PRUEBAS FARMACOLÓGICAS *IN VIVO*

##### III.1.1. ANIMALES

Se utilizan ratones albinos hembras de la raza Swiss, procedentes de la compañía Harlan Interfauna Ibérica, S.L., de tres meses de edad y peso entre 25-30 g. Una vez recibidos, se estabulan bajo condiciones estandarizadas: temperatura  $22 \pm 3$  °C, fotoperiodo 12/12 horas de luz/oscuridad; alimentación artificial y agua *ad libitum*. Los animales se distribuyen a razón de 5 ó 6 ratones por grupo en estudio.

##### III.1.2. REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA

###### III.1.2.1. Reacción de hipersensibilidad retardada inducida por aplicación tópica de 2,4-dinitro-1-fluorobenceno

La aplicación tópica de 2,4-dinitro-1-fluorobenceno (DNFB) tras la sensibilización con la misma sustancia, produce una reacción de hipersensibilidad por contacto, que se caracteriza por la aparición de una reacción eczematosa, con presencia de linfocitos, macrófagos y edema en la epidermis.

En la hipersensibilidad retardada inducida por DNFB (Fig. 7), los animales se sensibilizan por la aplicación tópica de 20  $\mu$ L de DNFB al 0,2 % (v/v) en acetona sobre el abdomen rasurado durante dos días consecutivos. A partir de entonces se siguen dos protocolos distintos, uno de pre-tratamiento donde los productos a ensayar se administran antes del desencadenamiento de la reacción inflamatoria y otro de post-tratamiento, donde los productos a

ensayar se administran tras el desencadenamiento (Brown y Shivji 1991). A su vez, el desencadenamiento puede realizarse a diferentes dosis de alérgeno.

Cinco días tras la sensibilización se provoca el desencadenamiento de la reacción mediante aplicación de 10 o 20  $\mu\text{L}$  de DNFB al 0,2% (v/v) en acetona (20 o 40  $\mu\text{g}$ , respectivamente) a ambos lados de la oreja del ratón. La reacción primaria se induce por aplicación tópica de 20 o 40  $\mu\text{g}$ /oreja de DNFB en oreja de animales no sensibilizados previamente. Los extractos, productos y el compuesto de referencia a ensayar se aplican por vía tópica ( $V_T = 20 \mu\text{L}$ ) a ambos lados de la oreja, siguiendo dos protocolos distintos de dosificación: a) 72, 48 y 24 h antes del desencadenamiento de la reacción, para el protocolo de pre-tratamiento y b) 2, 24, 48 y 72 h después del desencadenamiento de la reacción, para el protocolo de post-tratamiento. El espesor de las orejas se mide con un micrómetro digital 24 y 96 h después del desencadenamiento, tanto en el modelo de pre-tratamiento como en el de post-tratamiento. El edema se calcula como la diferencia de espesor de las orejas antes del tratamiento, y el espesor de las mismas a las 24 y 96 h tras el desencadenamiento.

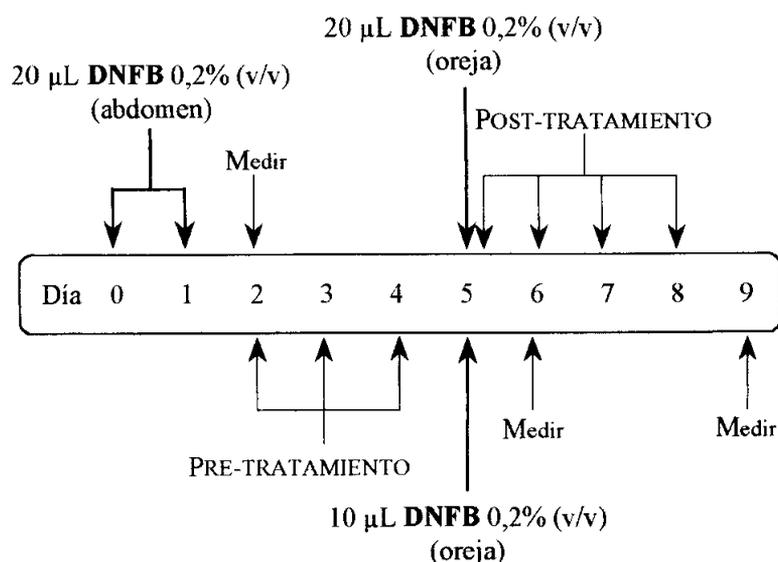


Figura 7. Esquema de los protocolos de administración en CHS

$$\% I = \frac{\overline{\Delta E_c} - \overline{\Delta E_p}}{\overline{\Delta E_c}} \times 100$$

siendo:

$\overline{\Delta E_c}$  = media aritmética del incremento de espesor auricular del grupo control

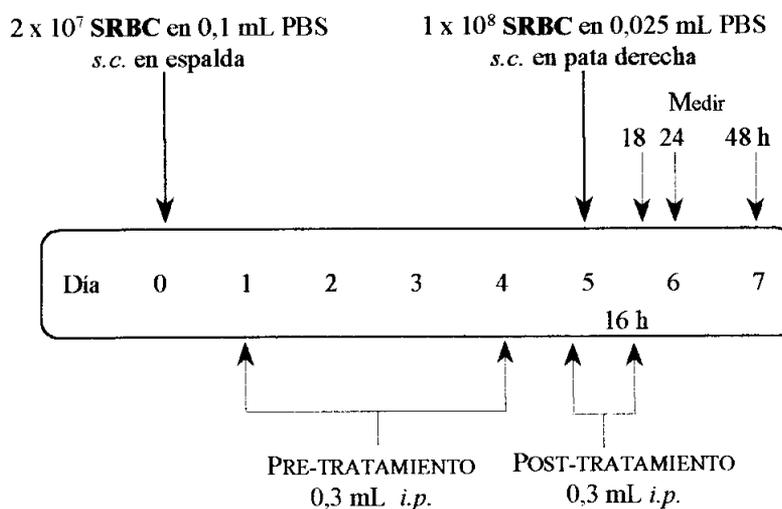
$\overline{\Delta E_p}$  = media aritmética del incremento de espesor auricular del grupo problema

### III.1.2.2. Reacción de hipersensibilidad inducida por administración de eritrocitos de cordero

La administración de eritrocitos de cordero (SRBC) desarrolla una reacción de hipersensibilidad de tipo tuberculínico, que tiene lugar, sobre todo, en la dermis. Se manifiesta con induración y se pueden observar linfocitos, monocitos y macrófagos.

Para el desarrollo de este modelo (Hurtel *et al.* 1992) los SRBC se reconstituyen en tampón fosfato salino (PBS), lavándolos tres veces mediante centrifugación y resuspendiéndolos nuevamente en el mismo tampón. Posteriormente los animales se sensibilizan mediante la inyección subcutánea en la espalda de  $2 \times 10^7$  eritrocitos en 0,1 mL de PBS. Cinco días después se induce el desencadenamiento de la reacción por inyección subcutánea de  $1 \times 10^8$  eritrocitos en 25  $\mu$ L de PBS en la aponeurosis plantar derecha. En la izquierda se inyecta el mismo volumen de PBS. La reacción primaria se induce por inyección de  $1 \times 10^8$  eritrocitos en las patas de ratones no sensibilizados previamente. Al igual que en el modelo anterior, se procede al estudio utilizando dos protocolos de administración de los compuestos a ensayar: uno de pre-tratamiento y otro de post-tratamiento. La administración intraperitoneal ( $V = 0,3$  mL) de los compuestos y referencia se realizan a las 96 y 24 h antes

del desencadenamiento de la reacción en el protocolo de pre-tratamiento, e inmediatamente antes y 16 h después en el de post-tratamiento (Fig. 8).



**Figura 8.** Esquema de los protocolos de administración en DTH

El espesor de las patas se mide con un micrómetro digital 18, 24 y 48 h tras el desencadenamiento de la reacción. El edema se calcula como la diferencia entre el espesor de las patas inflamadas (derechas) y las no inflamadas (izquierdas).

La actividad antiinflamatoria se evalúa mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del edema, según la expresión matemática siguiente:

$$\% I = \frac{\overline{\Delta E_c} - \overline{\Delta E_p}}{\overline{\Delta E_c}} \times 100$$

siendo:

$\overline{\Delta E_c}$  = media aritmética del incremento de espesor plantar del grupo control

$\overline{\Delta E_p}$  = media aritmética del incremento de espesor plantar del grupo problema

## III.2. PRUEBAS FARMACOLÓGICAS *IN VITRO*

### III.2.1. ANIMALES

Se usan ratas de la raza Wistar de tres meses de edad, con un peso entre 180-200 g (hembras) y entre 200-250 g (machos). Estos animales proceden de la cría efectuada en el estabulario de la Facultat de Farmàcia. Su desarrollo se realiza bajo condiciones estandarizadas: Temperatura  $22 \pm 3$  °C, fotoperiodo 12/12 horas de luz/oscuridad; alimentación artificial estándar y agua *ad libitum*.

### III.2.2. TAMPONES

PBS (Modificado por Dulbecco)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,420 g	10 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,408 g	3 mM
	NaCl	8,010 g	137 mM
	H <sub>2</sub> O	c.s.p. 1000 mL	4 °C
pH = 7,27			
Tampón de incubación (IKP)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,720 g	5 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,272 g	2 mM
	NaCl	8,010 g	137 mM
	KCl	0,201 g	2,5 mM
	H <sub>2</sub> O	c.s.p. 1000 mL	4 °C
	D-glucosa (en el momento de uso)	1 g	
pH = 7,30			
Tampón de lisis	Na <sub>2</sub> EDTA	0,037 g	0,1 mM
	KHCO <sub>3</sub>	0,272 g	9,5 mM
	NH <sub>4</sub> Cl	8,300 g	157 mM
	H <sub>2</sub> O	c.s.p. 1000 mL	4 °C
Solución de Hanks (HBSS) con Ca <sup>2+</sup> y Mg <sup>2+</sup>	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,099 g	1 mM
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,099 g	0,5 mM
	KCl	0,4 g	5 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,048 g	0,33 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,060 g	0,44 mM
	NaCl	8,0 g	137 mM
	H <sub>2</sub> O	c.s.p. 1000 mL	
	D-glucosa (en el momento de uso)	1 g	4 °C
pH = 7,4			

Tampón fosfato 10 mM-KCl	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,742 g	pH = 7,4	4 °C
	H <sub>2</sub> O	500 mL		
	KCl	11,5 g	c.s.p.	1000 mL
	H <sub>2</sub> O			
Tampón fosfato 50 mM-KOH (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -KOH)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7 g	pH = 7,4	4 °C
	H <sub>2</sub> O	c.s.p. 250 mL		
Tampón Tris-HCl 0,1M	Tris-base	3,028 g	pH = 7,4	4 °C
	H <sub>2</sub> O	200 mL		
	H <sub>2</sub> O	c.s.p. 250 mL	pH = 5,4	4 °C
Tampón fosfato sódico 80 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10,596 g	pH = 5,4	4 °C
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	14,256 g		
	H <sub>2</sub> O	c.s.p. 1000 mL	pH = 5,4	4 °C
Tampón fosfato sódico 0,22 M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	29,964 g		
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	39,204 g	pH = 5,4	4 °C
	H <sub>2</sub> O	c.s.p. 1000 mL		

### III.2.3. DISOLUCIONES

Acido ascórbico 10 mM	Acido ascórbico	17,6 mg	
	H <sub>2</sub> O	10 mL	
Azul tripano	Azul Tripano	0,5 g	Filtrar
	NaCl 0,9%	100 mL	Tª ambiente
BOC	3,2 mg en 1 mL de DMSO		Extemporánea
Ca <sup>2+</sup> (180 mM)	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	264,6 mg	4 °C
	H <sub>2</sub> O	10 mL	
Disolución de CCl <sub>4</sub>	1 parte de CCl <sub>4</sub> / 4 partes de DMSO		
Disolución generadora de NADPH	KCl (0,15 M)	18 mL	Cf = 0,2 mM Cf = 4 mM Cf = 0,6 U Extemporánea No reutilizar
	Tris-HCl (0,1M, pH 7,4)	12 mL	
	H <sub>2</sub> O	8 mL	
	NADPNa <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6 mg	
	Glucosa 6-fosfatoNa <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O pH = 7,4	55 mg	
	Glucosa 6-P-deshidrogenasa	60 µL	
DPPH madre	DPPH	10 mg	
	MeOH	c.s.p. 50 mL	

DPPH hija	DPPH madre MeOH	1 mL c.s.p. 10 mL	
EDTA 10 mM	EDTA KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -KOH, 50 mM, pH = 7,4	336 mg c.s.p. 100 mL	
Glucógeno	Glucógeno (1mg/g de peso de la rata) PBS Calentar a 40-50 °C agitando frecuentemente o baño de ultrasonidos hasta suspensión	10 mL	Extemporánea No reutilizar
Hipoxantina, 10 mM	Hipoxantina KOH, 50 mM	27,2 mg c.s.p. 20 mL	
Ionóforo de calcio (190 µM)	Ionóforo de calcio A23187 DMSO	1 mg 1 mL	4 °C
Ionóforo de calcio (1,9 µM)	Solución de ionóforo 190 µM PBS	100 µL 900 µL	4 °C
KOH, 50 mM	KOH H <sub>2</sub> O	750 mg c.s.p. 250 mL	
MTT	MTT PBS o H <sub>2</sub> O	5 mg 11 mL	Proteger de la luz -20 °C
NBT, 1 mM	NBT KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -KOH, 50 mM, pH = 7,4	8,18 mg c.s.p. 10 mL	
PGB <sub>2</sub> madre (1 mg/mL)	PGB <sub>2</sub> DMSO	1 mg 1 mL	-20 °C
PGB <sub>2</sub> (17 µg/mL)	PGB <sub>2</sub> madre (1 mg/mL) Metanol	100 µL 5,9 mL	-20 °C
TPA madre (5 mg/mL)	TPA DMSO	5 mg 1 mL	-20 °C
TPA (65 µg/mL)	TPA madre (1mg/mL) HBSS con Ca <sup>2+</sup> y Mg <sup>2+</sup>	13 µL 987 µL	-20 °C
Sulfato de hierro (II) 10 mM	FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O	27,8 mg 10 mL	
Sulfato de hierro (II) 100 µM	FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O (10 mM) H <sub>2</sub> O	100 µL c.s.p. 10 mL	
Xantina, 10 mM	Xantina KOH, 50 mM	30,4 mg c.s.p. 10 mL	
Xantina oxidasa	Xantina oxidasa (25 U/1,7 mL) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -KOH, 50 mM, pH = 7,4	45 µL c.s.p. 20 mL	

### III.2.4. OBTENCIÓN DE NEUTRÓFILOS

#### III.2.4.1. Obtención de neutrófilos peritoneales de rata

Este tipo de células se obtiene tras la inyección de glucógeno (1 mg/g peso corporal disuelto en 10 mL de PBS) en la cavidad peritoneal de la rata (fase de elicitación). Para ello el animal es ligeramente anestesiado con halotano (en campana de aire). Inmediatamente, se inyecta la disolución de glucógeno en la cavidad abdominal y se masajea suavemente en los costados de la rata de forma alternativa durante 1 min. Cuando el animal se recupera, se devuelve a su jaula con agua pero sin alimento sólido.

Cuatro horas después la rata es sacrificada por dislocación cervical, previa anestesia. Se inyectan *i.p.* 20 mL PBS a 37 °C y se masajea el abdomen durante 5 min. Se abre el abdomen a lo largo de la línea alba y se recoge con una jeringa el líquido, introduciéndolo en tubos de 15 mL. Se lava la cavidad peritoneal 2 veces más con 20 mL de PBS.

Los tubos se centrifugan a 300 g durante 10 min a 22 °C. El sobrenadante se elimina y se resuspenden las células en tampón de lisis. Se lava dos veces más con PBS centrifugando cada vez a 300 g durante 10 min a 22 °C, hasta obtener un *pellet* que se reconstituye en 5 mL de tampón de incubación (IKP) con glucosa.

#### III.2.4.2. Obtención de neutrófilos humanos

Los concentrados sanguíneos humanos (*buffy-coats*) procedentes de donantes sanos, proporcionados por el Centro de Transfusiones de la Comunitat Valenciana, son la fuente de leucocitos. El volumen de cada bolsa se distribuye en tubos de 50 mL (15 mL de concentrado/tubo) y se añaden 30 mL de PBS a cada uno. Se centrifuga a 300 g, 22 °C durante 10 min,

obteniéndose un sobrenadante rico en plaquetas y un *pellet* con eritrocitos y leucocitos.

Los *pellets* de leucocitos y hematíes se tratan con tampón de lisis y se centrifugan a 300 g, 22 °C durante 10 min. Se desecha el sobrenadante y se lava con PBS dos veces más, centrifugándose cada vez a 300 g, 22 °C durante 10 min. Se reconstituyen en HBSS con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .

### III.2.5. RECUENTO CELULAR

Se realiza una dilución 1:20 de la suspensión leucocitaria en un colorante vital como es el azul tripano. Se deja reposar 5 min y se procede al recuento en cámara de Neubauer. Además, se calcula el porcentaje medio de células teñidas de azul, no viables, en tres recuentos independientes.

### III.2.6. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

El efecto citotóxico de los productos puros sobre los distintos tipos celulares se mide usando el ensayo del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbromuro de tetrazolio (MTT) (Mosmann *et al.* 1983), que se basa en la conversión del MTT de color amarillo a su formazán de color azul oscuro. Esta reacción está catalizada por succinildeshidrogenasas mitocondriales.

Las células ( $1 \times 10^6/195 \mu\text{L}$  PBS) se tratan con 5  $\mu\text{L}$  de la muestra ( $C_f = 100 \mu\text{M}$ ) durante 30 min (en estufa a 37 °C) en una placa de 96 pocillos. Una vez eliminado el xenobiótico tras centrifugar la placa, se añade a cada pocillo 100  $\mu\text{L}$  de una disolución de MTT (0,45 mg/mL). Se incuba la placa a 37 °C (1-3 h) hasta la aparición de color azul (al menos en los controles). El medio se elimina y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de DMSO a cada pocillo que disuelve el formazán. El experimento se realiza por triplicado.

	Control	Muestra
Células	1×10 <sup>6</sup> /195 μL PBS	1×10 <sup>6</sup> /195 μL PBS
DMSO	5 μL	-
Fármaco	-	5 μL
Incubar a 37 °C, 30 min Centrifugar a 3000 rpm, 22 °C, 10 min Eliminar el sobrenadante		
MTT	100 μL	100 μL
Incubar a 37 °C, 1-3 h Centrifugar a 3000 rpm, 22 °C, 10 min Eliminar el sobrenadante		
DMSO	100 μL	100 μL
Agitar y llevar al baño ultrasonidos Medir la absorbancia a 490 nm		

La viabilidad de las células se calcula respecto al control al que sólo se le ha añadido DMSO, según la expresión matemática:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\overline{A}_m}{\overline{A}_c} \times 100$$

siendo:

$\overline{A}_c$  = media aritmética de la absorbancia del control

$\overline{A}_m$  = media aritmética de la absorbancia de la muestra

### III.2.7. ENSAYO DE ACTIVIDAD 5-LOX EN NEUTRÓFILOS PERITONEALES DE RATA

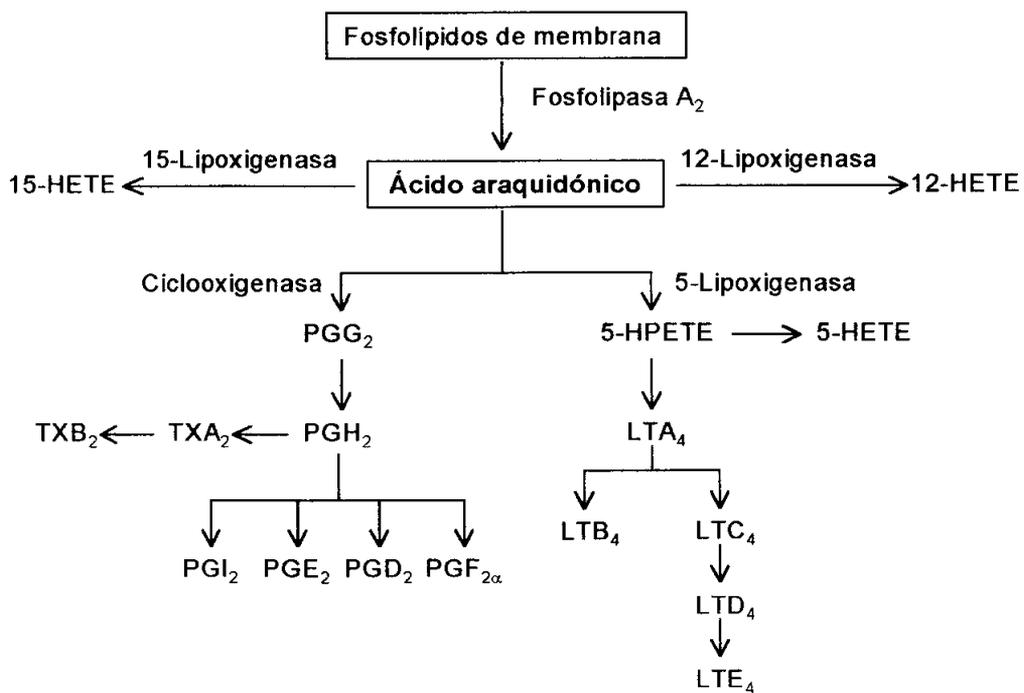
Los eicosanoides son lípidos insaturados que derivan del ácido araquidónico (AA). Dentro de los eicosanoides se incluyen prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs), leucotrienos (LTs), lipoxinas (LXs) y varios hidroxi- e hidroperoxiácidos grasos (Slater y McDonald-Gibson 1987).

Los eicosanoides juegan un papel importante en la regulación de diferentes procesos fisiológicos, pero también causan dolor, inflamación e hipersensibilidad. Se han encontrado niveles elevados de estos mediadores en enfermos de artritis reumatoide, asma, psoriasis, shock anafiláctico y colitis ulcerosa (Resch *et al.* 1998), por lo que el desarrollo de inhibidores de la síntesis de estos eicosanoides puede resultar un paso clave en la clínica de muchas enfermedades.

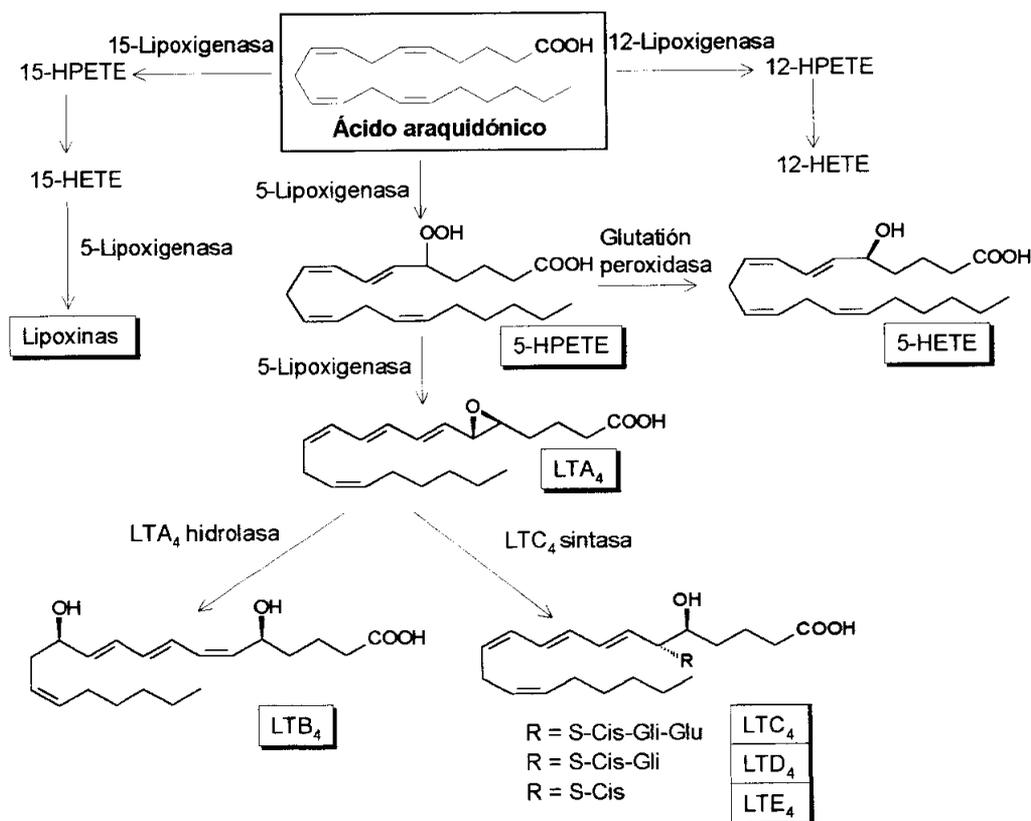
El AA es liberado de la posición *sn*-2 de los fosfolípidos de membrana por acción de PLA<sub>2</sub> activadas por estímulos mecánicos, químicos, físicos o por otros mediadores.

El AA puede ser metabolizado por dos vías diferentes, la vía COX o la vía LOX para dar lugar a los eicosanoides, mediadores lipídicos de la inflamación.

A continuación se presenta un esquema de la producción de eicosanoides a partir del AA liberado de los fosfolípidos de membrana.



Las lipoxigenasas (LOX) son una familia de enzimas, entre las que se encuentra la 5-, 12- y 15-LOX, que catalizan la oxidación del AA a sus correspondientes hidroperóxidos (HPETE). La 5-LOX convierte el ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE) en leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>), que es el primer paso en la síntesis del resto de LTs. El hidroperóxido puede ser reducido a 5-HETE por la glutatión peroxidasa (GPx). El LTA<sub>4</sub> puede, o bien ser convertido en LTB<sub>4</sub> por la enzima LTA<sub>4</sub>-hidrolasa, o bien puede conjugarse con glutatión reducido para dar LTC<sub>4</sub> por acción de la LTC<sub>4</sub>-sintasa. El LTC<sub>4</sub> puede sufrir modificaciones para dar lugar a los peptidil-leucotrienos: LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> y LTF<sub>4</sub> (Steinhilber *et al.* 1994).



El LTB<sub>4</sub> es un potente estimulador de las respuestas de leucocitos como son la quimiotaxis, la adhesión celular, la producción de anión superóxido, la translocación de calcio y la liberación de enzimas hidrolíticas (Henderson 1994).

Los granulocitos, monocitos/macrófagos, mastocitos y linfocitos B expresan la 5-LOX, mientras que plaquetas, células endoteliales, células T y eritrocitos carecen de 5-LOX (Steinhilber *et al.* 1994).

La actividad 5-LOX se mide atendiendo a la producción de LTB<sub>4</sub> y 5-HETE según el protocolo descrito por Safayhi *et al.* (1995).

Las células ( $5 \times 10^6$  PMNs) se suspenden en el tampón de incubación en un volumen final de 975  $\mu$ L y se introduce el tubo eppendorf en un baño a 37 °C. A continuación se incuba con la muestra a ensayar ( $C_f = 100 \mu$ M) durante 5 min. En ese momento los neutrófilos de rata son estimulados por la adición de ionóforo de calcio A23187 (100  $\mu$ g/mL) y calcio (26,5 mg/mL). De este modo se activa de modo preferente la síntesis de eicosanoides por la vía 5-LOX.

El protocolo seguido se describe a continuación:

Minuto	Acción
0	Introducir 975 $\mu$ L de suspensión de PMNs
5	5 $\mu$ L de fármaco o excipiente
10	10 $\mu$ L de ionóforo de calcio A23187 ( $C_f = 1,9 \mu$ M)
12	10 $\mu$ L de Ca <sup>2+</sup> ( $C_f = 1,8$ mM)
17	1000 $\mu$ L de MeOH/HCl 1 N (97:3) a 0 °C Cerrar, agitar e introducir en baño de hielo

Cada serie consta de un máximo de 10 problemas (fármacos) con un control al principio y otro al final (excipiente).

En cada experimento se toman tres muestras de células ( $5 \times 10^6$  PMNs) en un volumen final de 975  $\mu$ L de IKP y se procede a la determinación de la actividad 5-LOX en las condiciones del ensayo. Una muestra se incuba en

presencia de excipiente, otra en ausencia de éste y a la tercera no se le añade ionóforo. Tras procesar las muestras e inyectarlas en el HPLC, en las dos primeras se debe observar una producción de LTB<sub>4</sub> y 5-HETE en la proporción 1:1 y en la tercera una ausencia significativa de producción. Esto indica un correcto funcionamiento del metabolismo del AA endógeno, ausencia de inhibición de alguna de las vías metabólicas y falta de preactivación.

### III.2.7.1. Extracción en fase sólida

Para la extracción en fase sólida de los eicosanoides se sigue el protocolo de Werz *et al.* (1998), utilizando columnas de fase reversa (RP-18) de pequeño tamaño, dispuestas en batería y acopladas a vacío para acelerar el proceso. Como se produce una pequeña pérdida de los metabolitos que se encuentran en la fracción disuelta en las membranas celulares, se recurre al uso de un patrón interno, en este caso se añaden 10 µL de una disolución de PGB<sub>2</sub> (17 µg/mL) y se agita enérgicamente en un vórtex.

Previa a la extracción en fase sólida y tras la adición de PGB<sub>2</sub>, las muestras se centrifugan durante 5 min a 12000 g a 4 °C.

El proceso seguido para la extracción en fase sólida de los eicosanoides se recoge en la siguiente tabla:

FASE	ACCIÓN	EFEECTO	(mmHg)
Activación	1 mL MeOH 100% 1 mL H <sub>2</sub> O	Lavado Equilibrado	-20 a -10
Introducción de la muestra	2 mL sobrenadante	Extracción sólido/líquido	
Elución selectiva	1 mL H <sub>2</sub> O 1 mL MeOH 25%	Compuestos polaridad alta Compuestos polaridad media	-4 a -5
	300 µL MeOH 100%	Compuestos no polares y eicosanoides	

### III.2.7.2. Análisis de LTB<sub>4</sub> por HPLC

Existen varios métodos para la detección y cuantificación de los metabolitos del AA, entre ellos encontramos la CCF, HPLC acoplada a un detector UV o fotodiodos (DAD), CG acoplada a MS, radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoensayo (EIA), que difieren entre ellos en cuanto a su especificidad y su sensibilidad (Kumlin *et al.* 1996).

Los RIA y EIA son muy sensibles y son capaces de detectar cantidades de eicosanoides del orden de picogramos, pero el factor limitante es el uso de radioactividad o la disponibilidad del anticuerpo. La técnica acoplada a HPLC es capaz de cuantificar varios eicosanoides distintos en un solo análisis y no requiere el uso de anticuerpos o radioactividad, sin embargo sólo se pueden detectar compuestos que tengan grupos cromóforos en su estructura.

Está generalmente aceptado que la medida de la actividad 5-LOX, por la producción de 5-HETE, LTB<sub>4</sub> y sus isómeros, es un marcador válido para el hallazgo de inhibidores de la enzima. Aquellos metabolitos poseen grupos cromóforos que absorben a 235 ó 274-280 nm y por tanto, son fácilmente detectables y cuantificables, presentando correlación entre su absorbancia y su concentración.

#### A. Condiciones cromatográficas

Tras la inyección de las muestras (100 µL) en el cromatógrafo se lleva a cabo la separación de los eicosanoides, según las condiciones dadas por Safayhi *et al.* (1995).

Para la detección de LTB<sub>4</sub> se emplea un sistema de elución en gradiente utilizando: A) MeOH/H<sub>2</sub>O (74:26) conteniendo ácido trifluoroacético 0,007% B) MeOH (100%), con flujo de 1 mL/min y presión de 200 bar.

Programa de elución para los metabolitos de la 5-LOX:

Minuto	A	B
0-27	100 %	0 %
27,1-27,6	0 %	100 %
27,7-40,0	100 %	50 %

## B. Cuantificación de LTB<sub>4</sub>

Una vez obtenidos los cromatogramas y las correspondientes áreas de cada pico, se calcula la media del cociente LTB<sub>4</sub>/PGB<sub>2</sub> en cada muestra.

La media de los valores de los controles inicial y final de una serie será el 100% de producción del metabolito en dicha serie. Se refieren los cocientes de las muestras a este valor para obtener los porcentajes de producción y/o de inhibición respecto al control. Cada rata es considerada un n (experimento independiente). Los resultados son la media  $\pm$  error (mínimo n = 3).

## III.2.8. ENSAYO DE LA LIBERACIÓN/ACTIVIDAD DE ELASTASA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

### III.2.8.1. Ensayo de la liberación de elastasa

Siguiendo el protocolo de Barret (1981) se depositan  $1,25 \times 10^6$  de PMNs humanos suspendidos en 500  $\mu$ L de HBSS con Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>, en tubos de 1,5 mL. A continuación se procede según el protocolo siguiente:

Minuto	Acción
0	Introducir en baño con agitación a 37 °C
5	Añadir 5 $\mu$ L de muestra (problemas y blancos)
10	Añadir 5 $\mu$ L de TPA disolución hija (problemas) o DMSO (blancos)
25	Sacar, cerrar e introducir en hielo

Se centrifuga a 4000 rpm y 0 °C durante 10 minutos.

Seguidamente se distribuyen en sendos pocillos de microplaca dos alícuotas de 200 µL de sobrenadante. Se añaden a cada pocillo 5 µL de *N-tert*-butoxicarbonil-L-alanina-*p*-nitrofenil éster (BOC) y se incuban en estufa a 37 °C durante 30 minutos. Finalmente se mide la absorbancia a 414 nm.

### III.2.8.2. Ensayo de la actividad elastasa

Los resultados de la experiencia anterior pueden dar valores de inhibición, bien porque la muestra a ensayar inhiba la liberación del enzima bien porque inhiba su actividad catalítica o bien, ambas cosas al mismo tiempo. Para descartar una posible inhibición de la actividad, se enfrentan directamente la muestra y una solución conteniendo el enzima, obtenida de sobrenadantes de leucocitos estimulados por la acción del TPA.

Minuto	Acción
0	Introducir 20 x 10 <sup>6</sup> PMNs humanos en tubo de 14 mL Añadir 80 µL de TPA disolución hija (65 µg/mL) Baño con agitación a 37 °C
30	Centrifugar a 0 °C, 3000 rpm, 10 minutos Tomar el sobrenadante. Descartar el pellet
0	Incubar alícuotas de sobrenadante correspondientes a 1,25x10 <sup>6</sup> PMN Añadir 10 µL de muestra (C <sub>f</sub> = 100 µM) o vehículo Baño con agitación a 37 °C
15	Sacar, cerrar e introducir en hielo

Seguidamente se distribuyen en sendos pocillos de microplaca dos alícuotas de 200 µL de sobrenadante. Se añaden a cada pocillo 5 µL BOC y se incuban en estufa a 37 °C durante 30 minutos. Finalmente se mide la absorbancia a 414 nm.

### III.2.9. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE MIELOPEROXIDASA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Se sigue el método descrito por De Young *et al.* (1989), ligeramente modificado. Para ello se trabaja con el sobrenadante de PMNs estimulados con TPA, que contiene la enzima.

Minuto	Acción
0	Introducir $20 \times 10^6$ PMNs humanos en tubo de 14 mL Añadir 80 $\mu$ L de TPA disolución hija (65 $\mu$ g/mL) Baño con agitación a 37°C
30	Centrifugar a 0 °C, 3000 rpm, 10 minutos Tomar el sobrenadante. Descartar el pellet

A continuación se disponen en una microplaca de 96 pocillos:

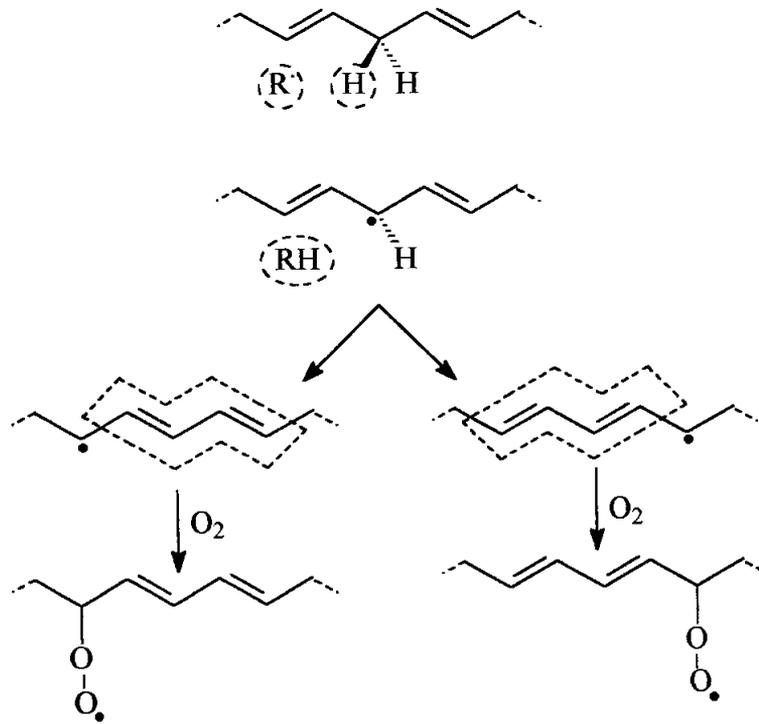
	Control	Muestra
PBS	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Tampón fosfato sódico 0,22 M (pH = 5,4)	85 $\mu$ L	85 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,017 %	15 $\mu$ L	15 $\mu$ L
Sobrenadante (equivalente a $1,25 \times 10^6$ PMNs)	30 $\mu$ L	30 $\mu$ L
Producto (C <sub>f</sub> = 100 $\mu$ M)	-	5 $\mu$ L
DMSO	5 $\mu$ L	-
Tetrametilbenzidina 1,84 mM en dimetilformamida 8%	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Incubar a 37 °C durante 3 min		
Baño de hielo		
AcONa 1,46 M (pH = 3)	30 $\mu$ L	30 $\mu$ L
Medir absorbancia a 630 nm		

### **III.2.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

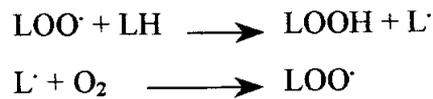
#### **III.2.10.1. Inhibición de la peroxidación lipídica microsomal**

La peroxidación lipídica es un proceso de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). En las vías del metabolismo del ácido araquidónico que conduce a la formación de prostaglandinas y leucotrienos existen enzimas que catalizan la incorporación de oxígeno a la cadena poliinsaturada, ya como endoperóxido (ciclooxigenasa) o como hidroperóxido (lipoxigenasa). Igualmente algunos enzimas citocromos están implicados en la oxidación del ácido araquidónico. Cuando el proceso de oxidación ocurre fuera de este control enzimático, se convierte en un proceso patológico. Así, en condiciones de estrés oxidativo, como ocurre en el fenómeno inflamatorio, en el que los leucocitos producen y liberan gran cantidad de radicales libres, se promueven una serie de reacciones en cadena que conduce finalmente a la degradación de los lípidos.

Estas reacciones en cadena se inician en AGPI debido a la facilidad con que algunos radicales son capaces de sustraer un hidrógeno del grupo metileno presente entre dos insaturaciones, y la estabilidad de las múltiples estructuras resonantes de los radicales formados (AGPI<sup>•</sup>). La propagación ocurre debido a que en la mayoría de los casos, la rápida reacción de estas formas resonantes con el oxígeno molecular conduce a la formación de radicales lipoperóxidos (AGPIOO<sup>•</sup>) reorganizados con dobles enlaces conjugados.



Este radical puede de nuevo sustraer un hidrógeno de un AGPI, para formar un hidroperóxido (AGPIOOH) y un segundo radical AGPI, el cual vuelve a reaccionar con el oxígeno molecular regenerando un nuevo radical lipoperóxido, propagando el proceso.



La fase de terminación ocurre cuando dos radicales libres reaccionan entre sí, o cuando el radical reacciona con una sustancia donadora de átomos de hidrógeno (llamada antioxidante, reductor o captador de radicales libres), dando lugar a productos inactivos (Hogg y Kalyanaraman 1999).

Como productos finales del proceso están hidroperóxidos, hidroxiácidos grasos, epoxiácidos grasos, aldehidos poliinsaturados, hidroxialdehidos,

dialdehidos, cetonas y otros, que pueden reaccionar con grupos amino de proteínas, fosfolípidos o ácidos nucleicos, comprometiendo el buen funcionamiento de las células y tejidos que los contienen.

Uno de los productos formados en este proceso es el malonildialdehido (MDA), que tiene la capacidad de formar aductos coloreados (rosa) con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) con máximo de absorción a 532 nm. Este es el mecanismo químico más usado para determinar la extensión de la peroxidación.

### **III.2.10.2. Preparación de microsomas hepáticos de rata**

Se utilizan ratas Wistar macho (200-250 g) mantenidas en ayunas desde el día anterior. Los animales son sacrificados y los hígados rápidamente extirpados y colocados en disolución amortiguadora fosfato 10 mM, pH 7,4, conteniendo 11,5 g/L de KCl a 0 °C, sobre hielo. El órgano es pesado, cortado en trozos y lavado tres veces con disolución amortiguadora a 0 °C. Se homogeneiza en disolución amortiguadora a 0 °C en proporción 1:3 (p/v). Se centrifuga a 12000 g durante 30 min a 4 °C.

El sobrenadante obtenido se centrifuga a 100000 g durante 60 min, recogiendo el precipitado que se homogeneiza con tampón en una proporción tal que se obtengan tantos mL como peso inicial de hígado. Se fracciona en alícuotas de 2-3 mL y se conservan a -70 °C, usándose dentro de los dos meses siguientes (Slater y Sawyer 1971).

### **III.2.10.3. Determinación del contenido proteico**

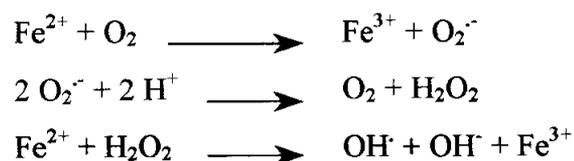
Se toma una alícuota y se diluye (1:200, 1:400) para determinar su contenido proteico por el método de Lowry (1951). El protocolo seguido se recoge en la siguiente tabla:

<b>Protocolo</b>	
Curva patrón	Realizar diluciones con PBS a partir de una dilución madre de 1 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA)
Diluciones	Realizar varias diluciones de microsomas con PBS Diluir el reactivo de Lowry 1:2 con H <sub>2</sub> O
Reacción	Introducir 100 µL de cada dilución en cada tubo por triplicado Añadir 1 mL del reactivo de Lowry a cada tubo Incubar 30 min a temperatura ambiente
Medida	Leer la absorbancia a 595 nm

Se aceptan duplicados con un 10% de error. Los valores deben estar dentro de la linealidad proporcionada por la curva patrón.

#### III.2.10.4. Peroxidación lipídica no enzimática. Sistema Fe<sup>2+</sup>/Ascorbato

La generación no enzimática de OH<sup>•</sup> puede ocurrir a partir de la autooxidación del Fe<sup>2+</sup> y la posterior dismutación del O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, haciendo que la reacción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con el Fe<sup>2+</sup> remanente promueva la formación de radical OH<sup>•</sup>, que iniciará la peroxidación lipídica de las membranas microsomales.



En este sistema, la mezcla Fe<sup>2+</sup>/Ascorbato se comporta como un catalizador de la peroxidación lipídica, ya que el ión ferroso que pasa a estado férrico durante el proceso es reducido nuevamente por el ascorbato.

Para un volumen final de 1 mL, se toman 0,9 mL de la suspensión microsomal diluida previamente en una disolución 1:2 v/v de tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) y KCl 1,12%, para obtener así una concentración final de proteínas de 2 mg/mL. La peroxidación lipídica es inducida por la adición de

50  $\mu\text{L}$  de ascorbato ( $C_f$  10 mM) y 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeSO}_4$  ( $C_f$  = 100  $\mu\text{M}$ ). La mezcla de reacción se incuba a 37 °C durante 20 min. La reacción es detenida tras la adición de 1 mL de una disolución de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, manteniéndose en hielo durante 10 min. Tras centrifugar durante 10 min a 3000 rpm y 4 °C se toma 1 mL del sobrenadante y se le añade 1 mL TBA 0,7%. Los tubos son calentados en baño de agua a 90 °C durante 30 min y finalmente, tras ser enfriados se mide la absorbancia a 532 nm (Pompella *et al.* 1987).

En cada experiencia tendremos un tubo control, donde la absorbancia será máxima puesto que es donde mayor peroxidación lipídica se produce, un tubo blanco para conocer el grado de peroxidación espontánea del material lipídico en ausencia del inductor, un tubo de la muestra a ensayar y otro con su blanco. En la medida que los productos ensayados sean activos, la generación de material reactivo se verá disminuido.

El protocolo seguido se detalla a continuación:

	Muestra	Blanco muestra	Control	Blanco
Susp. microsomal ( $C_f$ 2 mg/mL)	900 $\mu\text{L}$	900 $\mu\text{L}$	900 $\mu\text{L}$	900 $\mu\text{L}$
Muestra a ensayar	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	-	-
Vehículo	-	-	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
Agua destilada	-	100 $\mu\text{L}$	-	100 $\mu\text{L}$
Ascorbato 10 mM ( $C_f$ 500 $\mu\text{M}$ )	50 $\mu\text{L}$	-	50 $\mu\text{L}$	-
$\text{FeSO}_4$ 100 $\mu\text{M}$ ( $C_f$ 5 $\mu\text{M}$ )	50 $\mu\text{L}$	-	50 $\mu\text{L}$	-
Incubar en baño de agua a 37 °C, 20 min				
TCA 10% (0 °C)	1000 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$
Enfriar en baño de hielo 10 min				
Centrifugar a 3000 rpm, 4 °C, 10 min				
Sobrenadante	1000 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$
TBA 0,7%	1000 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$
Incubar en baño de agua a 90 °C, 30 min				
Enfriar en hielo				
Medir absorbancia a 532 nm				

Las muestras ensayadas, al igual que la referencia 2,6-di-(*tert*-butil)-4-metilfenol (BHT) son disueltas en DMSO.

La actividad antioxidante se evalúa mediante el cálculo del porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica, según la fórmula siguiente:

$$\% I = \frac{\overline{\Delta A_c} - \overline{\Delta A_m}}{\overline{\Delta A_c}} \times 100$$

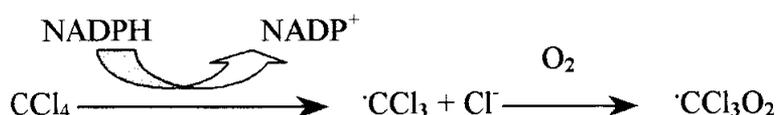
siendo:

$\overline{\Delta A_c}$  = media aritmética del incremento de absorbancia del control

$\overline{\Delta A_m}$  = media aritmética del incremento de absorbancia de la muestra

### III.2.10.5. Peroxidación lipídica enzimática. Sistema CCl<sub>4</sub>/NADPH

El sistema citocromo P<sub>450</sub> presente en la membrana de los microsomas hepáticos, es activado por la adición de NADPH. Como consecuencia de esto el CCl<sub>4</sub> añadido es transformado en una especie radicalaria muy reactiva, como es el radical triclorometilperoxilo, que inicia la peroxidación lipídica.



Para realizar la experiencia se toman 880 μL de la solución generadora de NADPH, compuesta por NADPNa<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O (C<sub>f</sub> = 0,2 mM), glucosa-6-fosfato Na<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (C<sub>f</sub> = 4 mM) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (C<sub>f</sub> = 0,6 U/mL) en una solución formada por 18 mL de KCl (0.15 M), 12 mL de tampón Tris-HCl (0.1 M, pH = 7,4) y 8 mL de H<sub>2</sub>O, todo ello ajustado a un pH de 7,4. Posteriormente se adiciona 10 μL de la muestra a ensayar o vehículo, 10 μL de CCl<sub>4</sub> disuelto en DMSO (1:4) y tras la adición de la suspensión microsomal

( $C_f$  1,5 mg/mL) se agitan y se incuban los tubos a 37 °C durante 15 min. La peroxidación es detenida por la adición de TCA (10 %), manteniendo los tubos en hielo durante 10 min. Tras centrifugar a 3000 rpm, durante 10 min a 4 °C, se opera como en el protocolo anterior.

Al igual que en el sistema  $Fe^{2+}$ /ascorbato, tendremos un tubo control que presentará el máximo de absorción, un tubo muestra y los respectivos blancos. En estos últimos se medirá el grado de peroxidación inducida exclusivamente por el NADPH presente en el medio de reacción en ausencia de  $CCl_4$ .

Los productos y la referencia (BHT) son disueltos en DMSO.

El protocolo seguido (Slater y Sawyer 1971), se detalla a continuación:

	Muestra	Blanco muestra	Control	Blanco
Disolución generadora de NADPH	880 $\mu$ L	880 $\mu$ L	880 $\mu$ L	880 $\mu$ L
Muestra a ensayar	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	-	-
Vehículo	-	-	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
DMSO	-	10 $\mu$ L	-	10 $\mu$ L
Disolución de $CCl_4$ ( $C_f$ 0,02 M)	10 $\mu$ L	-	10 $\mu$ L	-
Suspensión microsomal ( $C_f$ 1,5 mg/mL)	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Incubar en baño de agua a 37 °C, 20 min				
TCA 10 % (0 °C)	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
Enfriar en baño de hielo 10 min Centrifugar a 3000 rpm, 4 °C, 10 min				
Sobrenadante	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
TBA 0,7 %	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
Incubar en baño de agua a 90 °C, 30 min Enfriar en hielo Medir absorbancia a 532 nm				

La actividad antioxidante se evalúa mediante el cálculo del porcentaje de inhibición, según la fórmula expresada en el apartado anterior.

### III.2.10.6. Efecto sobre el radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo

El fundamento de esta técnica consiste en la medición a 517 nm de la reducción del radical estable 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>). La absorbancia característica de este radical que posee un color violeta intenso, disminuye en presencia de un antioxidante (AH) u otro radical (R<sup>•</sup>). Es posible, por tanto, cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que poseen determinados compuestos mediante la determinación del grado de decoloración que dichos compuestos provocan a una disolución metanólica de DPPH.



Según el protocolo de Cavin *et al.* (1998) se introduce en un tubo de reacción 7,5 µL de la muestra a ensayar, vehículo o referencias (BHT y quercetina-7-O-glucósido) a las concentraciones estudiadas, 250 µL de agua destilada y 500 µL de la disolución de DPPH (20 mg/mL). Tras incubación a temperatura ambiente durante 5 min, se lee la absorbancia a 517 nm.

	Muestra	Blanco muestra	Control	Blanco
Muestra a ensayar	7,5 µL	7,5 µL	-	-
Vehículo	-	-	7,5 µL	7,5 µL
Agua destilada	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL
DPPH	500 µL	-	500 µL	-
Metanol	-	500 µL	-	500 µL

Incubar a temperatura ambiente, 5 min  
Leer absorbancia a 517 nm

La capacidad captadora de radicales libres (capacidad de decoloración) se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Capacidad de decoloración} = \frac{\overline{A}_m - \overline{A}_c}{\overline{A}_c} \times 100$$

siendo:

$\overline{A}_c$  = media aritmética de la absorbancia del control

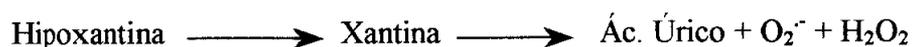
$\overline{A}_m$  = media aritmética de la absorbancia de la muestra

### III.2.10.7. Inhibición de la formación de ROS

#### III.2.10.7.1. Generación del radical superóxido mediante el sistema hipoxantina/xantina oxidasa

El radical superóxido es el primer producto de la reducción univalente del oxígeno. Supone el primer radical formado y además de ser activo por sí mismo en el proceso inflamatorio, da lugar a otras especies oxigenadas de importancia.

La xantina oxidasa es capaz de generar  $O_2^{\cdot -}$  *in vivo* por la oxidación de los productos que provienen del catabolismo de las bases púricas. Esta enzima cataliza las siguientes reacciones de oxidación:



El  $O_2^{\cdot -}$  generado en esta secuencia de reacciones, debido a su carácter reductor, puede reducir compuestos como el azul de nitrotetrazolio (NBT), que al ser reducido por el  $O_2^{\cdot -}$  da lugar a la formación de un cromóforo (formazán) que presenta un máximo de absorción a 560 nm. Aquellos compuestos captadores de  $O_2^{\cdot -}$  disminuirán la velocidad de formación de dicho cromóforo. Es necesario descartar una posible interferencia del compuesto con la enzima

mediante una modificación del ensayo. Igualmente se ha de determinar si el mismo compuesto puede comportarse como reductor del NTB.

Este método es altamente sensible y aunque el NBT no es reducido de modo específico por el  $O_2^-$ , no es fácilmente reducible por compuestos fenólicos, lo que lo hace un método de elección cuando se evalúan muestras que contienen este tipo de compuestos, especialmente con sustitución catecol.

Conforme al protocolo seguido (Sanz *et al.* 1994) la mezcla de reacción (volumen total de 1 mL, en cubeta de plástico o cristal) contiene 680  $\mu$ L de tampón  $KH_2PO_4$ -KOH (50 mM, pH 7,4), 10  $\mu$ L de hipoxantina 10 mM ( $C_f = 100 \mu$ M), 100  $\mu$ L  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$  10 mM ( $C_f = 1$  mM), 100  $\mu$ L de NBT 1 mM ( $C_f = 100 \mu$ M) y 10  $\mu$ L del producto a ensayar, de la referencia pirogalol o del vehículo. Tras agitar se dispone en la celda espectrofotométrica y se inicia la reacción con la adición de 100  $\mu$ L xantina oxidasa ( $C_f = 0,06$  UI/mL), diluida recientemente en el tampón utilizado, e inmediatamente se realiza la determinación cinética de la variación de la absorbancia a 560 nm durante 2 min.

El grupo control presenta el máximo de radical superóxido generado durante la reacción según nuestras condiciones experimentales. También ensayamos blancos de la reacción, en los que no adicionamos la enzima, para comprobar que no exista reducción espontánea del NBT. Si adicionamos a la mezcla de reacción un producto que se comporte como captador de radicales superóxido, disminuye la velocidad de la reacción de reducción del NBT. Es importante ensayar blancos del producto a fin de descartar una posible interferencia de nuestro producto en estudio con el sistema detector, ya que algunos compuestos podrían reducir al NBT.

A continuación se describe el protocolo seguido:

	Muestra	Blanco muestra	Control	Blanco
Tampón fosfato-KOH (50 mM)	680 µL	780 µL	680 µL	780 µL
Hipoxantina 10 mM (C <sub>f</sub> 100 µM)	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O 10 mM (C <sub>f</sub> 1 mM)	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
NBT 1 mM (C <sub>f</sub> 100 µM)	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Muestra a ensayar	10 µL	10 µL	-	-
Vehículo	-	-	10 µL	10 µL
Agitar y mezclar bien				
Xantina oxidasa (C <sub>f</sub> = 0,06 UI/mL)	100 µL	-	100 µL	-
Leer absorbancia a 560 nm durante 2 min				

Se realiza la determinación cinética de la variación de la absorbancia durante dos minutos y los resultados se expresan como porcentajes de inhibición de la reducción del NBT.

### III.2.10.7.2. Generación de radical superóxido en neutrófilos humanos estimulados con TPA

Las células fagocíticas son fundamentales en la defensa del organismo frente a agresiones externas, siendo las encargadas de destruir y eliminar al agente invasor. La estimulación de las células fagocíticas produce una serie de alteraciones metabólicas y un aumento del consumo de oxígeno, que conllevan a la producción y liberación de especies reactivas del oxígeno (radical superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, entre otros). Además también tiene lugar la desgranulación leucocitaria, vertiendo el contenido de los gránulos al interior de la vacuola fagocítica o al exterior (Weiss 1989). Las células fagocíticas destruyen al agente invasor con la generación de especies radicalarias del oxígeno y la liberación de enzimas hidrolíticas contenidas en los gránulos lisosómicos.

La adición de TPA a una suspensión de leucocitos en reposo induce la explosión respiratoria y el proceso de desgranulación leucocitaria. El TPA produce la activación de la PKC, responsable de la fosforilación y consecuente activación de la enzima NADPH oxidasa (Nishizuka 1984). Esta enzima se encuentra asociada a la cara externa de las células fagocíticas y cataliza la reducción del oxígeno molecular a radical superóxido (Weiss 1989).

Como método de detección se emplea la reducción del NBT. Se procede según el protocolo descrito por Montesinos *et al.* (1995). Así, se distribuyen en eppendorf de 1,5 mL  $2,5 \times 10^6$  de células polimormonucleares (PMNs) humanos en 500  $\mu$ L de HBSS con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Se le añaden 5  $\mu$ L de NBT y 5  $\mu$ L de fármaco (100  $\mu$ M) o excipiente. Se incuba en baño con agitación a 37 °C durante 5 min. Seguidamente se añaden 5  $\mu$ L de TPA ( $C_f = 1 \mu\text{M}$ ), agente inductor de la reacción. Se incuba en baño con agitación a 37 °C durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugan los eppendorf a 3000 rpm, durante 10 min a 4 °C. A continuación se elimina el sobrenadante y se solubiliza el precipitado con 500  $\mu$ L de DMSO:HCl (95:5). Se toman alícuotas de 250  $\mu$ L y se disponen en los pocillos de una microplaca. Finalmente se mide la absorbancia a 560 nm.

	Muestra	Blanco muestra	Control	Blanco
2,5 x 10 <sup>6</sup> PMNs	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
NTB	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
Muestra a ensayar	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	-	-
Vehículo	-	-	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
Incubar en baño con agitación a 37 °C, 5 min				
TPA ( $C_f$ 1 $\mu$ M)	5 $\mu$ L	-	5 $\mu$ L	-
Incubar en baño con agitación a 37 °C, 10 min Centrifugar a 3000 rpm, 4 °C, 10 min Decantar y eliminar el sobrenadante				
Solubilizar precipitado con 500 $\mu$ L DMSO:HCl (95:5) (agitar y ultrasonidos) Tomar alícuotas de 250 $\mu$ L y disponerlas en las microplacas				
Medir la absorbancia a 560 nm				

El porcentaje de inhibición de la producción de radical superóxido se expresa según la fórmula:

$$\% I = \frac{\overline{\Delta A_c} - \overline{\Delta A_m}}{\overline{\Delta A_c}} \times 100$$

siendo:

$\overline{\Delta A_c}$  = media aritmética del incremento de absorbancia del control

$\overline{\Delta A_m}$  = media aritmética del incremento de absorbancia de la muestra

### III.2.10.8. Inhibición de xantina oxidasa

Productos inhibidores de la actividad de la enzima xantina oxidasa producirán una disminución en la generación de anión superóxido por este sistema, por tanto la reducción de NBT será menor que en los controles. Así pues, es necesario comprobar si nuestros compuestos actúan a este nivel. Tal y como se describió en el apartado III.2.4.7.1., esta enzima cataliza la oxidación de las bases xánticas a ácido úrico, cuyo máximo de absorción se encuentra a 295 nm, lo cual permite hacer un seguimiento espectrofotométrico de la reacción.

Para ello, se introduce en una cubeta de reacción 100  $\mu$ L de xantina oxidasa ( $C_f = 0,06$  UI/mL) y 10  $\mu$ L de la muestra a ensayar, vehículo o referencia (alopurinol). Se incuba a temperatura ambiente durante 15 min, transcurrido dicho tiempo se añaden 780  $\mu$ L de tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$  (50 mM, pH 7,4), 100  $\mu$ L  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $C_f = 1$  mM) y 10  $\mu$ L xantina ( $C_f = 100$   $\mu$ M). A continuación se mide la absorbancia a 295 nm durante dos minutos.

	Muestra	Blanco muestra	Control	Blanco
Xantina oxidasa ( $C_f$ 0,06 UI/mL)	100 $\mu$ L	-	100 $\mu$ L	-
Muestra a ensayar	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	-	-
Vehículo	-	-	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Tampón fosfato-KOH ( 50 mM)	-	100 $\mu$ L	-	100 $\mu$ L
Incubar a temperatura ambiente 15 min				
Tampón fosfato-KOH ( 50 mM)	780 $\mu$ L	780 $\mu$ L	780 $\mu$ L	780 $\mu$ L
$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM ( $C_f$ 1 mM)	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Xantina ( $C_f$ 100 $\mu$ M)	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Medir absorbancia a 295 nm durante 2 min				

Se realiza la determinación cinética de la variación de absorbancia durante dos minutos. Los resultados se expresan como porcentajes de inhibición de la producción de ácido úrico.

### III.2.10.9. Reversibilidad de la inhibición de xantina oxidasa

Para estudiar la reversibilidad de una inhibición de xantina oxidasa se incuba la enzima (1,0 U/mL) con el compuesto a ensayar a la concentración de 100  $\mu$ M durante 30 minutos a la temperatura de 25 °C. Transcurrido este tiempo se procede al lavado usando una unidad de ultrafiltración Millipore® con tamaño de poro de 10 kDa. Tras llevar el concentrado enzimático al volumen inicial y filtrarlo dos veces más, se procede a la medida de la actividad de modo idéntico a lo explicado en el apartado III.2.10.8.

	Control	Muestra
Xantina oxidasa 1,0 U/mL, en tampón fosfato-KOH 50 mM, pH = 7,4	250 µL	250 µL
Muestra	-	2,5 µL
Vehículo	2,5 µL	-
Incubar a temperatura ambiente 30 min Lavado por ultracentrifugación (3 veces)		
Completar con tampón fosfato pH = 7,4	250 µL	250 µL
Medir actividad enzimática		

### III.2.10.10. Interacción con el centro molibdeno catalítico de xantina oxidasa

Este ensayo se realiza para estudiar la posible interacción del compuesto inhibidor con el centro molibdeno de xantina oxidasa. Para ello se evalúa la transferencia de electrones desde enzima a la sustancia aceptora de electrones 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) mediante monitorización de la medición de la absorbancia de dicha sustancia a 600 nm.

	Muestra	Blanco muestra	Control	Blanco
Tampón fosfato-KOH (50 mM)	680 µL	780 µL	680 µL	780 µL
Hipoxantina 10 mM (C <sub>f</sub> 100 µM)	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O 10 mM (C <sub>f</sub> 1 mM)	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
DCPIP (5 mM)	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Muestra a ensayar	10 µL	10 µL	-	-
Vehículo	-	-	10 µL	10 µL
Agitar y mezclar bien				
Xantina oxidasa (C <sub>f</sub> 0,06 UI/mL)	100 µL	-	100 µL	-
Leer absorbancia a 600 nm durante 2 min				

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro del programa seguido por nuestro grupo de investigación para el estudio de productos naturales activos en inflamación cutánea, una parte del trabajo se dedicó al estudio de los fenómenos de hipersensibilidad retardada (DTH). La mayoría de los experimentos se basaron en el uso de un modelo de dermatitis alérgica por oxazolona, un agente que produce una respuesta violenta en la piel, con abscesos y necrosis en determinadas muestras. La aplicación de condiciones más suaves, mediante el empleo de dinitrofluorobenceno a concentraciones moderadas, permitió definir un modelo descrito en el **artículo nº 1** de este compendio. Su finalidad fue demostrar la eficacia antiinflamatoria *in vivo* de dos inhibidores de PKC y compararla con la de fármacos antiinflamatorios e/o inmunosupresores, con la idea-guía de que la PKC es considerada elemento esencial en la iniciación de la DTH por estimular la migración de las células de Langerhans epidérmicas (Halliday y Lucas 1993). Se emplearon pautas de administración pre- y post-desencadenamiento, en dos modelos diferentes en ratón: hipersensibilidad de contacto (CHS) por dinitrofluorobenceno y DTH clásica, o genuina, por eritrocitos de cordero (SRBC). Aunque siempre se ha considerado que la CHS es una forma de DTH, cada vez se impone más la idea de singularizar la CHS como una entidad independiente, caracterizada, entre otras cosas, por la presencia de la proteína inflamatoria de macrófagos  $1\alpha$  y por su regulación negativa por células  $CD4^+$ , si bien hay que tener en cuenta que los rasgos comunes son numerosos (Grabbe y Schwarz 1998).

Cuando se analizan los resultados de los fármacos estudiados sobre la CHS por dinitrofluorobenceno lo primero que se aprecia es que, salvo alguna particularidad, los compuestos, administrados antes del desencadenamiento, son más activos cuanto menor es la subsiguiente dosis de dinitrofluorobenceno. Ello, que parece farmacológicamente razonable, tiene su reverso en que,

cuando se administran después, suelen ser más eficaces frente a una mayor dosis de dinitrofluorobenceno. Para ilustrar este fenómeno vemos el caso de trifluoperazina, inactiva a las 24 h y reductora del edema a las 96 h en un 47% frente a una dosis de 20  $\mu\text{g}$ , mientras que inhibidora en 39% y 59% a las 24 y 96 h, respectivamente, frente a una dosis de 40  $\mu\text{g}$ . Azatioprina mostró diferencias todavía más exageradas. Una posible explicación pasaría por el hecho de que el desencadenamiento con 40  $\mu\text{g}$  ponga en marcha algún mecanismo reductor de la inflamación, posiblemente la activación de algún tipo celular supresor, en la misma línea de lo que ocurre con la fase de sensibilización (Grabbe y Schwarz 1998) aunque verificarlo requiere estudios profundos.

Por lo que respecta al efecto de los inhibidores de PKC, trifluoperazina fue siempre más activo que palmitoilcarnitina, lo que sugiere un papel definido para la interacción con calmodulina, una proteína portadora de calcio intracelular con un papel muy importante en la regulación de la actividad enzimática, particularmente en la fosforilación. Ello se justifica porque trifluoperazina es un conocido antagonista de la calmodulina (Wise y Kuo 1983), mientras que palmitoilcarnitina carece de dicha propiedad. La comparación de eficacia entre trifluoperazina y otros agentes es satisfactoria para con el antimetabolito azatioprina, siendo por el contrario notoriamente desfavorable, si se admite la expresión, con dexametasona, puesto que este glucocorticoide se mostró el fármaco más activo, en cualquier condición, y a dosis menores.

Prácticamente en paralelo con este trabajo basado en la aplicación de productos sintéticos, se desarrolló la fase inicial del estudio de actividad antiinflamatoria en DTH de especies mediterráneas de Asteráceas. ¿Por qué se escogió esta familia y, dentro de ella, la tribu de la Inuleas?. La razón esencial hay que buscarla en la experiencia previa de nuestro grupo sobre especies de

dicha tribu, tales como *Helichrysum stoechas* (Recio *et al.* 1991) o *Imula viscosa* (Máñez *et al.* 1999), que permitió la identificación de determinados principios antiinflamatorios.

Como paso previo al análisis de los resultados sobre *Phagnalon rupestre* que figuran en esta Tesis, debemos mencionar que el extracto metanólico de esta especie destacó en los tests de CHS y, en menor medida en SRBC, sobre los de otras especies de Inuleas, como *Phagnalon saxatile* y *Pallenis spinosa*. Para la investigación fitoquímica de *P. rupestre* se siguió en sus fases iniciales un proceso de aislamiento guiado por bioensayo, en concreto CHS por dinitrofluorobenceno, recogido en el **artículo nº 3**, procediendo al fraccionamiento líquido/líquido del extracto metanólico, para dar cuatro fracciones de polaridad creciente, hexánica, diclorometánica, aceto-etílica y butanólica.

El subextracto aceto-etílico fue el más activo, inhibiendo significativamente el edema en porcentajes superiores al 50%, tanto a las 24 h como a las 96 h. Los subextractos hexánico y butanólico resultaron menos efectivos, inhibiendo la reacción en un rango del 35-50% a las diferentes determinaciones. A la vista de estos resultados, los subextractos aceto-etílico y butanólico fueron sometidos a un análisis fitoquímico exhaustivo, mientras que no se procedió de un modo análogo con el subextracto hexánico, dada su composición química, muy compleja y eminentemente lipídica.

La aplicación de técnicas cromatográficas preparativas descritas en el **artículo nº 2**, permitió el aislamiento de ocho compuestos fenólicos del subextracto aceto-etílico, identificados por técnicas espectroscópicas como tres prenil-hidroquinonas glucosiladas, cuatro derivados cafeilquínicos y un heterósido flavónico. A saber: 1-*O*- $\beta$ -glucopiranosil-1,4-dihidroxi-2-(3',3'-dimetilalil) benceno (ó 2-(3',3'-dimetilalil)hidroquinona-1-glucósido), 1-*O*- $\beta$ -glucopiranosil-1,4-dihidroxi-2-(3'-hidroximetil-3'-metilalil) benceno, 1-*O*-(4"-

*O*-cafeil)- $\beta$ -glucopiranosil-1,4-dihidroxi-2-(3',3'-dimetilalil) benceno, éster metílico del ácido 3,5-di-*O*-cafeilquinico, éster metílico del ácido 4,5-di-*O*-cafeilquinico, ácido 3,5-di-*O*-cafeilquinico, ácido 4,5-di-*O*-cafeilquinico y luteolina-7-*O*- $\beta$ -glucósido.

A partir del subextracto butanólico se aislaron, como se describe en el **artículo n° 4**, por precipitación y purificación cromatográfica, otros seis compuestos asimismo fenólicos: un lignano, una prenil-hidroquinona glucosilada, dos acetofenonas y dos heterósidos flavónicos. Estos fueron identificados por técnicas espectroscópicas como: 7,7'-bis-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-8,8'-dihidroximetil-tetrahidrofuran-4-*O*- $\beta$ -glucopiranosido, 1-*O*- $\beta$ -glucopiranosil-1,4-dihidroxi-2-(3'-hidroxi-3'-metilbutil) benceno, 12-*O*- $\beta$ -glucopiranosil-9 $\beta$ ,12-dihidroxitremetona, piceína, apigenina-7-*O*- $\beta$ -glucósido y luteolina-7-*O*- $\beta$ -glucurónico.

De entre los catorce compuestos fenólicos identificados en *P. rupestre*, un total de seis —cuatro prenilhidroquinonas glucosiladas, un lignano tetrahidrofuranico y una acetofenona benzofuranica— se describen por primera vez en la naturaleza.

Aunque la estructura dimetilalil-(o isoprenil)-bencénica es relativamente frecuente en vegetales, los derivados hidroquinónicos de este tipo tienen una distribución restringida, lo mismo que podríamos decir para las hidroquinonas simples. En el caso que nos ocupa, la forma heterosídica es novedosa. El azúcar aporta estabilidad a la molécula, evitando la oxidación que la convertiría en el análogo prenil-benzoquinona, el cual ya había sido aislado previamente en esta especie (Hausen y Schulz 1977). Algunos invertebrados marinos nos proporcionan derivados hidroquinónicos biológicamente activos, estrechamente relacionados bajo el punto de vista químico con los que ahora nos ocupan, caracterizados por cadenas terpénicas de longitud variable, a menudo hidroxiladas, como las esponjas marinas del género *Ircinia*, entre

otros. Sin embargo, avarol aislado de *Disidea avara* y sifonodictial de *Siphonodyction coralliphagum*, presentan un núcleo hidroquinónico unido a un esqueleto terpenoide bicíclico, y no lineal como era el caso de los productos de *Ircinia*. En plantas superiores se han identificado otros compuestos relacionados como heptadecenil-hidroquinonas en *Tapirira guaianensis* (Anacardiaceae) y glaziovianol en *Auxemma glazioviana* (Boraginaceae).

El lignano está estrechamente relacionado desde el punto de vista estructural con icariol-A<sub>2</sub>, lignano previamente identificado en *Epimedium sagittatum* (Berberidaceae), pero difiere en la presencia de un residuo de glucosa en el C-4 del anillo aromático, ausente en este último. Además de la glucosilación, otra diferencia significativa es que el valor de la constante de acoplamiento entre los protones H-7 (H-7') y H-8 (H-8') es 4 Hz, presentando una configuración *cis* opuesta a la de estos mismos protones en icariol-A<sub>2</sub> (8 Hz, *trans*) (Matsushita *et al.* 1991).

Una gran parte de los lignanos y neolignanos aislados de plantas provienen de especies de Dialipétalas, así como de otros taxones aún más primitivos como las Gimnospermas, siendo, por el contrario, las familias más evolucionadas más pobres en esos compuestos. Por ello, la familia Asteráceas no se caracteriza precisamente por ser una importante fuente de lignanos. Aún así, se ha descrito la presencia de diferentes tetrahidrofuranos sustituidos y, más frecuentemente, 2,6-diaril-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octanos, como son los derivados del pinosinol en *Mikania saltensis* (Cuenca y Catalán 1991) o de la sesamina en *Artemisia arborescens* (Marco *et al.* 1997), tal como se recogen en la discusión del **artículo nº 4**. Sin embargo, esta es la primera vez que se encuentra un derivado 2,5-difeniltetrahidrofuránico en esta familia.

En cuanto a la presencia de furano-acetofenonas, se ha de señalar que, aunque son muy típicas de las Asteráceas, no se localizan aleatoriamente en las especies de esta familia, sino principalmente en las tribus Astereas, Eupatorieas, Heliantreas, Inuleas y Senecioneas (Proksch y Rodríguez 1983). La

presencia del derivado hidroxitremetona, y en menor grado de importancia, de piceína, refuerza la proximidad entre *Phagnalon* y *Helichrysum*, posiblemente uno de los géneros mejor estudiados de la tribu Inuleas.

Finalizado el estudio fitoquímico, se procedió a evaluar la actividad de los componentes de los subextractos activos. La actividad *in vivo* únicamente se pudo determinar para los ocho compuestos fenólicos del subextracto acetotético en CHS inducida por dinitrofluorobenceno, dado la elevada cantidad de producto necesaria para el ensayo. De todos ellos, el glucósido de luteolina resultó ser el más activo. La eficacia de este flavonoide (49% y 79% de inhibición a las 24 y 96 h) así como de las hidroquinonas (45% y 73% de inhibición para la hidroxiprenilada) y de los derivados ácido 3,5-dicafeilquinico y éster metílico del 4,5-dicafeilquinico, se intensificó 96 h después del desencadenamiento, aunque en distinto grado. El aumento de efecto con el paso del tiempo, así como por la aplicación repetida del producto, sugiere la existencia de un mecanismo antiinflamatorio posiblemente independiente del proceso de desencadenamiento, causante en definitiva de la reacción de hipersensibilidad. Sin embargo, el hecho de que una única aplicación del flavonoide y de las hidroquinonas hidroxiprenilada y cafeilada reduzca notablemente la reacción a las 24 h, sugiere que, al menos, estos tres compuestos también deben interferir en los procesos inmediatos al desencadenamiento, como es entre otros, la desgranulación de mastocitos dérmicos inducida por los linfocitos T activados.

A la hora de justificar, de acuerdo con la literatura científica conocida, los posibles mecanismos implicados en la actividad del glucósido de luteolina, nos encontramos con información muy abundante y dispar sobre los flavonoides como antiinflamatorios, justo al contrario de lo que ocurre con las hidroquinonas. Sin embargo, ni para uno ni otro tipo de compuestos existen datos suficientes sobre su actividad en CHS. Se podría señalar, por una parte, el efecto inhibitor de PKC que poseen muchos flavonoides, particularmente

aquellos que presentan una insaturación en el C-2 (flavonas y flavonoles) y a la vez, un agrupamiento catecol (3',4'-dihidroxi) en el anillo B. Una flavona muy próxima, apigenina, se ha descrito como inhibidora de CHS inducida por oxazolona, muy posiblemente debido a sus propiedades inhibitorias de la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) en células endoteliales (Gerritsen *et al.* 1995).

En cuanto a las prenil-hidroquinonas, debemos remitirnos a los compuestos anteriormente citados procedentes de *Ircinia* y *Disidea* (Gil *et al.* 1995; Ferrándiz *et al.* 1994) activos como inhibidores de la liberación de eicosanoides, lo que tiene una notoria incidencia en el proceso inflamatorio con independencia de su etiología.

Debido a la interconexión existente entre los numerosos eventos que contribuyen al desarrollo del proceso inflamatorio, entre ellos el estrés oxidativo por especies reactivas del oxígeno, y la liberación de enzimas proteolíticos y productos del metabolismo del ácido araquidónico, se evaluó la actividad de las tres prenil-hidroquinonas y los cuatro derivados cafeilquínicos en diversos modelos químicos y celulares, tal y como se recoge en los **artículos nº 5 y nº 6**. Únicamente los compuestos que presentan uno o dos restos cafeilo fueron activos en los dos modelos de peroxidación lipídica, enzimático y no enzimático, presentando una inhibición del orden del 60% a 10  $\mu\text{M}$  en el primer sistema, mientras que en el segundo fueron más activos (80% de inhibición), a excepción de la hidroquinona (47%). La potencia manifestada por dichos compuestos fue del mismo rango en los dos modelos ensayados (3-11  $\mu\text{M}$ ). Estos mismos compuestos resultaron potentes inhibidores de la captación del radical DPPH ( $\text{IC}_{50} < 5 \mu\text{M}$ ). Bajo un punto de vista estructural, hay que señalar que así como el resto cafeilo es un requisito indispensable para la actividad, la presencia de uno o dos restos cafeilo, su posición y la metilación o no del ácido no parecen influir.

En el modelo enzimático de producción del radical superóxido a partir del sistema hipoxantina/xantina oxidasa, al igual que en los tres modelos anteriores, sólo estos compuestos fueron activos, presentando los derivados dicafeilquínicos una eficacia del orden de 90-100% de inhibición y una potencia entre 1,3-2,3  $\mu\text{M}$ , siendo de 5,8  $\mu\text{M}$  para la cafeíl-hidroquinona. Posteriormente se demostró que el efecto manifestado por el éster metílico del ácido 4,5-dicafeilquínico se debía a una actividad inhibidora enzimática y seguramente no tanto a la captadora del radical. En cambio, el éster metílico del ácido 3,5-dicafeilquínico, aunque si bien es igualmente un inhibidor de dicha enzima, su moderada potencia ( $\text{IC}_{50} = 30 \mu\text{M}$ ) no justificaría, al menos en su totalidad, la elevada actividad manifestada en el modelo hipoxantina/xantina oxidasa, indicando más bien, que tanto la captación radicalaria como la inhibición enzimática pudieran participar en su mecanismo de acción. Tras el análisis cinético para estos dos compuestos se comprobó que la inhibición producida era competitiva reversible y que no modificaban la transferencia de electrones de la xantina al compuesto aceptor DCPIP, sugiriendo que los inhibidores no reaccionan con el centro de molibdeno. De estos resultados se deduce que la metilación promueve la actividad inhibidora de la enzima xantina oxidasa, y que la esterificación en el C-4 del éster metílico del ácido quínico, en lugar del C-3, incrementa la potencia en un orden de magnitud, superando los efectos aditivos esperados de la existencia de un segundo resto cafeílo en la molécula. De la misma manera, la ausencia de actividad inhibidora enzimática por parte de los otros tres compuestos remarca su actividad captadora del radical superóxido.

Con el fin de profundizar en el conocimiento sobre el modo de actuación de estos compuestos como antialérgicos y antiinflamatorios en CHS, fueron ensayados en un sistema celular, para relacionarlo, si fuera posible, con aquellos datos obtenidos de actividad antioxidante y antiradicalaria. Para ello

se utilizaron PMNLs, cuyo papel, no sólo en el proceso inflamatorio en general, sino también en la fase de desencadenamiento de la reacción de CHS, es bien reconocido. Entre los parámetros relacionados con la función neutrofílica, se evaluó, en el **artículo nº 6**, la capacidad de los compuestos de inhibir la desgranulación, referida ésta a la liberación de la enzima proteolítica elastasa. Los conjugados dicafeilquínicos fueron los más activos, resultando el ácido 3,5-dicafeilquínico el más potente ( $IC_{50} = 4,8 \mu M$ ). Al descartar su posible efecto inhibitor de la actividad de la propia enzima, se comprobó que la acción era debida a una marcada reducción de la exocitosis de los gránulos azurófilos intracelulares. La cafeil-hidroquinona mostró una moderada actividad debida a una inhibición conjunta, tanto de la liberación enzimática como de la propia actividad.

Otra enzima importante en el proceso inflamatorio es la mieloperoxidasa. Ésta es responsable, debido a la formación del agente pro-oxidante ácido hipocloroso, tanto de los efectos beneficiosos como de los perjudiciales producidos en el entorno en el que se libera. Los conjugados dicafeilquínicos metilados inhibieron la liberación de la enzima con una potencia entorno a  $60 \mu M$ .

Únicamente los derivados dicafeilquínicos, con ligera preponderancia de los ésteres metílicos del ácido quínico, inhibieron la generación del radical superóxido, con porcentajes del 75-82% a  $100 \mu M$ , presentando valores de  $IC_{50}$  de  $27,0-42,5 \mu M$ . La cafeil-hidroquinona, con un efecto moderado sobre la enzima mieloperoxidasa, fue incapaz de inhibir la formación de superóxido.

La cafeil-hidroquinona y los derivados dicafeilquínicos, principalmente los no metilados, produjeron una marcada inhibición de la formación de leucotrieno  $B_4$ , obteniéndose para la primera una potencia  $35 \mu M$ . La combinación del resto aril-prenilado y del éster con cafeilo presente en la hidroquinona parece ser crucial para aumentar la actividad cuando se compara

con la de sus análogos parciales, mientras que la metilación del grupo carboxilo en los conjugados dicafeilquínicos incrementa el efecto frente a los derivados libres. La reducción en la producción de leucotrieno B<sub>4</sub> por los dicafeilquínicos pudiera atribuirse en parte a sus efectos antioxidantes, no siendo así desde luego para la cafeil-hidroquinona, para la que sería interesante estudiar su interacción con enzimas claves en la síntesis de leucotrieno B<sub>4</sub>, como son 5-lipoxigenasa y leucotrieno A<sub>4</sub> hidrolasa.

De todos los resultados, salvando las limitaciones propias en la comparación de un estudio *in vitro* a otro *in vivo*, parece posible extraer la idea de que la actividad antioxidante, si bien está implicada en todo proceso inflamatorio, no parece ser crucial en el modelo de CHS, ya que los compuestos más activos como antioxidantes (dicafeilquínicos), no resultan los más activos en hipersensibilidad (hidroquinonas hidroxiprenilada y cafeilada). Así, la relativamente alta actividad de la primera en CHS, no parece depender de sus actividades antioxidantes, ya que carece de efecto en todos los modelos ensayados. En cambio, aunque la actividad antioxidante no es necesaria para ejercer un efecto en CHS, no implica que dicha actividad no participe en el efecto antiinflamatorio observado para algunos de nuestros compuestos. Esto es lo que podría ocurrir en la cafeil-hidroquinona y éster metílico del ácido 3,5-dicafeilquínico, dados sus efectos sobre peroxidación lipídica, inhibición de producción y/o captación de radicales libres y CHS. Junto a esto, también se observa para estos compuestos, una inhibición en la producción del potente agente quimiotáctico leucotrieno B<sub>4</sub>, actividad que resultaría en una disminución en la afluencia de neutrófilos a las zonas subyacentes a las de aplicación del hapteno. Estos efectos se verían además potenciados por la inhibición en la actividad de las enzimas claves en la destrucción del agente invasor pero igualmente lesivas para el entorno que lo rodea, como son elastasa y mieloperoxidasa, que redundaría en la atenuación de los signos característicos de la reacción de CHS.

## **CONCLUSIONES**

## V. CONCLUSIONES

**Primera:** A partir de la especie *Phagnalon rupestre* se han identificado catorce compuestos, seis de los cuales son nuevos heterósidos fenólicos de distinta naturaleza: cuatro prenilhidroquinonas, 2-(3',3'-dimetilalil)hidroquinona-1-*O*- $\beta$ -glucopiranosido y sus derivados 4'-hidroxilo, 4"-cafeilo y 2',3'-dihidro-3'-hidroxilo; un lignano, 7,7'-bis-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-8,8'-dihidroximetil-tetrahidrofuran-4-*O*- $\beta$ -glucopiranosido y una acetofenona 9 $\beta$ ,12-dihidroxitremetona-12-*O*- $\beta$ -glucopiranosido.

**Segunda:** Se ha demostrado la actividad antiinflamatoria y antialérgica de *Phagnalon rupestre* en hipersensibilidad por contacto inducida por dinitrofluorobenceno, y determinado como principios responsables de dicha actividad el glucósido de luteolina, las hidroquinonas 4'-hidroxiprenilada y cafeilada, y los derivados ácido 3,5-dicafeilquinico y éster metílico del ácido 4,5-dicafeilquinico.

**Tercera:** Únicamente los compuestos que presentan restos cafeílo inhibieron la peroxidación lipídica, enzimática y no enzimática, con potencias del rango de 3-11  $\mu$ M, además de comportarse como potentes captadores del radical difenilpicrilhidrazilo y del radical superóxido (1-6  $\mu$ M). Se ha demostrado que la formación de ésteres metilados sobre el carboxilo del ácido quinico confiere actividad inhibidora de xantina-oxidasa, siendo la inhibición producida por el éster metílico del ácido 3,5-dicafeilquinico reversible y competitiva, sin afectar al centro catiónico de la enzima.

**Cuarta:** Ensayados en diversas funciones leucocitarias, los conjugados dicafeilquínicos redujeron la actividad mieloperoxidasa, inhibieron la liberación de elastasa y de superóxido, resultando la cafeil-hidroquinona inactiva es esta última faceta. Se puede afirmar que la conjugación del ácido cafeico, tanto de la glucosil-hidroquinona como del ácido quínico, es importante para la inhibición de la formación de leucotrieno B<sub>4</sub>, lo cual otorga a esos compuestos valor como potenciales agentes antiinflamatorios.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## VI. BIBLIOGRAFÍA

Ali-Shtayeh MS, Yaghmour RM, Faidi YR, Salem K, Al-Nuri MA (1998)  
“Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the  
Palestinian area”

*J. Ethnopharmacol.* **60**: 265-271

Azuma K, Nakayama M, Koshioka M, Ippoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K,  
Yamauchi Y, Ito H, Higashio H (1999)

“Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L.”

*J. Agric. Food Chem.* **47**: 3963-3966

Agarwal R, Diwanay S, Patki P, Patwardhan B (1999)

“Studies on immunomodulatory activity of *Withania somnifera*  
(Ashwagandha) extracts in experimental immune inflammation”

*J. Ethnopharmacol.* **67**: 27-35

Barret AJ (1981)

“Leukocyte elastase”

*Meth. Enzymol.* **80**: 581-588

Benencia F, Courrèges MC, Coulombié FC (2000)

“In vivo and in vitro immunomodulatory activities of *Trichilia glabra* aqueous  
leaf extracts”

*J. Ethnopharmacol.* **69**: 199-205

- Basnet P, Matsushige K, Hase K, Kadota S, Namba T (1996)  
“Four di-*O*-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models”  
*Biol. Pharm. Bull.* **19**: 1479-1484
- Bicchi C, Nano GM, Tira S (1975)  
“n-Paraffin components of some Gnaphalieae”  
*Planta Med.* **28**: 389-391
- Bicchi C, Frattini C, Nano GM, Tira S (1979)  
“Hexahydrofarnesylacetone from *Phagnalon rupestre*”  
*Relata Tech.* **11**: 64
- Brown WR, Shivji GM (1991)  
“Dose and timing studies for the optimization of contact sensitivity in the mouse”  
*Acta Derm. Venereol.* **71**: 44-47
- Cartron E, Carbonneau MA, Fouret G, Descomps B, Léger CL (2001)  
“Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds: LDL protection against oxidation and decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production”  
*J. Nat. Prod.* **64**: 480-486
- Cavin A., Hostettmann K, Dyatmyko W, Potterat O (1998)  
“Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*”  
*Planta Med.* **64**: 393-396

Chalas J, Claise C, Edeas M, Messaoudi C, Vergnes L, Abella A, Lindenbaum A (2001)

“Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation”

*Biomed. Pharmacother.* **55**: 54-60

Choi SY, Moon CK (1997)

“Effects of brazilin on the altered immune functions in the early phase of halothane intoxication of C57BL/6 mice”

*Planta Med.* **63**: 400-404

Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D (1998)

“Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers”

*J. Nat. Prod.* **61**: 71-76

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (1998)

“Lesión y muerte celular”. En: **Patología estructural y funcional**. (Schoen FJ Ed.), 5ª ed., Mc Graw-Hill-Interamericana, Madrid, pp 1-37

Cottiglia F, Loy G, Garau D, Floris C, Casu M, Pompei R, Bonsignore L (2001)

“Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L.”

*Phytomedicine* **8**: 302-305

Cuéllar MJ, Giner RM, Recio MC, Just MJ, Máñez S, Cerdá M, Hostettmann K, Rios JL (1997)

“Zanhasaponins A and B, antiphospholipase A<sub>2</sub> saponins from an antiinflammatory extract of *Zanha africana* root bark”

*J. Nat. Prod.* **60**: 1158-1160

Cuenca MR, Catalán CAN (1991)

“Monoterpenes and lignans from *Mikania saltensis*”

*J. Nat. Prod.* **54**: 1162-1164

Davis L, Kuttan G (2000)

“Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*”

*J. Ethnopharmacol.* **71**: 193-200

Dolci M, Tira S (1984)

“Flavonoids of Gnaphalieae”

*Mat. Nat.* **116**: 315-318

el-Dahmy SI, Abdel Aal M, Abd el-Fatah H, Fid F (1994)

“Thymol derivatives from *Phagnalon sinaicum* Bornm & Kneuck”

*Acta Pharm. Hung.* **64**: 115-116

Engler A (1964)

**Syllabus der Pflanzenfamilien**, part II, Gebrüder Bornträger, Berlin, p 489

Facino RM, Carini M, Aldini G, Saibene L, Pietta P, Mauri P (1995)  
“Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation: A potential use of *Echinacea* extracts in the prevention of skin photodamage”

***Planta Med.* 61: 510-514**

Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL (2001)  
“CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation and lipid metabolism”

***J. Clin. Invest.* 108: 785-791**

Ferezou JP, Berreur-Bonnenfant J, Meusy JJ, Barbier M, Suchy M, Wipf HK (1977)

“6,10,14-Trimethylpentadecan-2-one and 6,10,14-trimethyl-5-trans, 9-trans, 13-pentadecantrien-2-one from the androgenic glands of the male crab *Carcinus maenas*”

***Experientia* 33: 290**

Ferrándiz ML, Sanz MJ, Bustos G, Payá M, Alcaraz MJ, De Rosa S (1994)  
“Avarol and avarone, two new anti-inflammatory agents of marine origin”

***Eur. J. Pharmacol.* 253: 75-82**

Fraga CG, Martino VS, Ferraro GE, Coussio JD, Boveris A (1987)

“Flavonoids as antioxidants evaluated by *in vitro* and *in situ* liver chemiluminescence”

***Biochem. Pharmacol.* 36: 717-720**

Friedman J, Yaniv Z, Dafni A, Palewitch D (1986)

“A preliminary classification of the healing potential of medicinal plants, based on a rational analysis of an ethnopharmacological field survey among Bedouins in the Negev desert, Israel”

***J. Ethnopharmacol.* 16: 275-287**

Gaertner M, Muller L, Roos JF, Cani G, Santos AR, Niero R, Calixto JB, Yunes RA, Delle Monache F, Cechinel-Filho V (1999)

“Analgesic triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots”

***Phytomedicine* 6: 41-44**

Ganguly T, Sainis KB (2001)

“Inhibition of cellular immune responses by *Tylophora indica* in experimental models”

***Phytomedicine* 8: 348-355**

Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen CP, Phan SA, Ligon GF, Perry CA (1995)

Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression

***Am. J. Pathol.* 147: 278-292**

Ghelardini C, Galeotti N, Mazzanti G (2001)

“Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils”

***Planta Med.* 67: 564-566**

Gil B, Sanz MJ, Terencio MC, De Giulio A, De Rosa S, Alcaraz MJ, Payá M (1995)

“Effects of marine 2-polyprenyl-1,4-hydroquinones on phospholipase A<sub>2</sub> activity and some inflammatory responses”

*Eur. J. Pharmacol.* **285**: 281-288

Giner RM, Villalba ML, Recio MC, Máñez S, Cerdá M, Ríos JL (2000)

“Anti-inflammatory glycoterpenoids from *Scrophularia auriculata*”

*Eur. J. Pharmacol.* **389**: 243-252

Gómez MA, Sáenz MT, García MD, Fernández MA (1999)

“Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models”

*Z. Naturforsch.* **54**: 937-941

Gómez MA, García MD, Sáenz MT (2001)

“Cytostatic activity of *Achillea ageratum* L.”

*Phytother. Res.* **15**: 633-634

Gopalakrishna R, Jaken S (2000)

“Protein kinase C signaling and oxidative stress”

*Free Radic. Biol. Med.* **28**: 1349-1361

Grabbe S, Schwarz T (1998)

“Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity”

*Immunology Today* **19**: 37-43

Halliday GM, Lucas AD (1993)

“Protein kinase C transduces the signal for Langerhans’ cell migration from the epidermis”

*Immunology* 79: 621-626

Hatano T, Yasuhara T, Yoshihara R, Agata I, Noro T, Okuda T (1990)

“Effects of interaction of tannins with co-existing substances. VII. Inhibitory effects of tannins and related polyphenols on xanthine oxidase”

*Chem. Pharm. Bull.* 38: 1224-1229

Hausen BM, Schulz KH (1977)

“Sensitizing capacity of naturally occurring quinones. Part III. A new contact allergen (2-dimethylallyl-1,4-benzoquinone) from *Phagnalon* sp. (Compositae)”

*Planta Med.* 32: 287-293

Heilmann J, Merfort I, Weiss M (1995)

“Radical scavenger activity of different 3',4'-dihydroxyflavonols and 1,5-dicaffeoylquinic acid studied by inhibition of chemiluminescence”

*Planta Med.* 61: 435-438

Henderson WR (1994)

“The role of leukotrienes in inflammation”

*Ann. Intern. Med.* 2: 684-697

Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA (2000)

“Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury”

*Free Radic. Biol. Med.* 28: 1456-1462

- Herrmann K (1989)  
“Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods”  
*Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **28**: 315-347
- Hippeli S, Heiser I, Elstner EF (1999)  
“Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants”  
*Plant Physiol. Biochem.* **37**: 167-178
- Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K (2001)  
“Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation”  
*J. Nut. Sci. Vitaminol.* **47**: 357-362
- Hogg N, Kalyanaraman B (1999)  
“Nitric oxide and lipid peroxidation”  
*Biochim. Biophys. Acta* **1411**: 378-384
- Huguet AI, Recio MC, Máñez S, Giner RM, Ríos JL (2000)  
“Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase activators, neuronally-acting irritants and other agents”  
*Eur. J. Pharmacol.* **410**: 69-81
- Hurtrel B, Maire MA, Hurtrel M, Lagrange PH (1992)  
“Different time course patterns of local expression of delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells in mice”  
*Cell. Immunol.* **142**: 252-263

Ivanovska N, Philipov S, Istatkova R, Georgieva P (1996)  
“Antimicrobial and immunological activity of ethanol extracts and fractions from *Isopyrum thalictroides*”  
**J. Ethnopharmacol.** **54**: 143-151

Jiang RW, Ma SC, But PP, Mak TC (2001)  
“New antiviral cassane furanoditerpenes from *Caesalpinia minax*”  
**J. Nat. Prod.** **64**: 1266-1272

Kasai R, Sasaki A, Hashimoto T, Kaneko T, Ohtani K, Yamasaki K (1999)  
“Cycloartane glycosides from *Trichosanthes tricuspidata*”  
**Phytochemistry** **51**: 803-808

Kimura Y, Okuda H, Okuda T, Hatano T, Agata I, Arichi S (1984)  
“Studies of the activities of tannins and related compounds, V. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver”  
**Planta Med.** **50**: 473-477

Kimura Y, Okuda H, Okuda T, Hatano T, Agata I, Arichi S (1985)  
“Studies of the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs, VI. Inhibitory effects of caffeoylquinic acids on histamine release from rat peritoneal mast cells”  
**Chem. Pharm. Bull.** **33**: 690-696

Kimura Y, Okuda H, Okuda T, Hatano T, Arichi S (1987)  
“Studies of the activities of tannins and related compounds, X. Effects of caffetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes”  
**J. Nat. Prod.** **50**: 392-399

- Kodoma M, Wada H, Otani H, Kohmoto K, Kimura Y (1998)  
“3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, an infection-inhibiting factor from *Pyrus pyrifolia* induced by infection with *Alternaria alternata*”  
***Phytochemistry* 47: 371-373**
- Kong LD, Abliz Z, Zhou CX, Li LJ, Cheng CHK, Tan RX (2001)  
“Glycosides and xanthine oxidase inhibitors from *Conyza bonariensis*”  
***Phytochemistry* 58: 645-651**
- Koo GC, Blake JT, Shah K, Staruch MJ, Dumont F, Wunderler D, Sánchez M, McManus OB, Sirotina-Meisher A, Fischer P, Boltz RC, Goetz MA, Baker R, Bao J, Kayser F, Rupprecht KM, Parsons WH, Tong XC, Ita IE, Pivnichny J, Vincent J, Cunningham P, Hora DJr, Feeney W, Kaczorowski G, *et al.* (1999)  
“Correolide and derivatives are novel immunosuppressants blocking the lymphocyte Kvl.3 potassium channels”  
***Cell. Immunol.* 197: 99-107**
- Kumlin M (1996)  
“Analytical methods for the measurement of leukotrienes and other eicosanoids in biological samples from asthmatic subjects”  
***J. Chromatogr. A* 725: 29-40**
- Kunikata T, Tatefuji T, Aga H, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M (2000)  
“Indirubin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity”  
***Eur. J. Pharmacol.* 410: 93-100**

- Kwon HC, Jung CM, Shin CG, Lee JK, Choi SU, Kim SY, Lee KR (2000)  
“A new caffeoylquinic acid from *Aster scaber* and its inhibitory activity against human immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) integrase”  
**Chem. Pharm. Bull.** **48**: 1796-1798
- Lentsch AB, Ward PA (1999)  
“Activation and regulation of NF- $\kappa$ B during acute inflammation”  
**Clin. Chem. Lab. Med.** **37**: 205-208
- Lin L-C, Kuo Y-C, Chou C-J (1999)  
“Immunomodulatory principles of *Dichrocephala bicolor*”  
**J. Nat. Prod.** **62**: 405-408
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ (1951)  
“Protein measurement with the folin phenol reagent”  
**J. Biol. Chem.** **193**: 265-275
- Luo CN, Lin W, Li WK, Pu F, Wang LW, Xie SS, Xiao PG (1998)  
“Effect of berbamine on T-cell immunity and the prevention of rejection on skin transplants in mice”  
**J. Ethnopharmacol.** **59**: 211-215
- Máñez S, Recio MC, Gil I, Gómez C, Giner RM, Waterman PG, Ríos JL (1999)**  
“A glycosyl analogue of diacylglycerol and other antiinflammatory constituents from *Imula viscosa*”  
**J. Nat. Prod.** **62**: 601-604

Marco JA, Sanz-Cervera JF, Morante MD, García-Lliso V, Vallés-Xirau J, Jakupovic J (1996)

“Tricyclic sesquiterpenes from *Artemisia chamaemelifolia*”

*Phytochemistry* 41: 837-844

Mateo G, Crespo MB (1990)

**Claves para la Flora Valenciana.** Del Cénia al Segura, Valencia, p 133

Matsushita H, Miyase T, Ueno A (1991)

“Lignan and terpene glycosides from *Epimedium sagittatum*”

*Phytochemistry* 30: 2025-2027

Meyer AS, Donovan JL, Pearson DA, Waterhouse AL, Frankel EN (1998)

“Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation *in vitro*”

*J. Agric. Food Chem.* 46: 1783-1787

Montesinos MC, Úbeda A, Terencio MC, Payá M, Alcaraz MJ (1995)

“Antioxidant profile of mono- and dihydroxylated flavone derivatives in free radical generating systems”

*Z. Naturforsch.* 50c: 552-560

Mori H, Fuchigami M, Inoue N, Nagai H, Koda A, Nishioka I (1994)

“Principle of the bark of *Phellodendron amurense* to suppress the cellular immune response”

*Planta Med.* 60: 445-449

- Mori H, Fuchigami M, Inoue N, Nagai H, Koda A, Nishioka I (1995)  
“Principle of the bark of *Phellodendron amurense* to suppress the cellular immune response: Phellodendrine on cellular and humoral immune responses”  
***Planta Med.* 61: 45-49**
- Morton LW, Croft KD, Puddey IB, Byrne L (2000)  
“Phenolic acids protect low density lipoproteins from peroxynitrite-mediated modification *in vitro*”  
***Redox Rep.* 5: 124-125**
- Mosmann T (1983)  
“Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays”  
***J. Immunol. Methods* 65: 55-63**
- Mungantiwar AA, Nair AM, Shinde UA, Dikshit VJ, Saraf MN, Thakur VS, Sainis KB (1999)  
“Studies on the immunomodulatory effects of *Boerhaavia diffusa* alkaloidal fraction”  
***J. Ethnopharmacol.* 65: 125-131**
- Nardini M, Pisu P, Gentili V, Natella F, Di Felice M, Piccolella E, Scaccini C (1998)  
“Effect of caffeic acid on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937 cells”  
***Free Radic. Biol. Med.* 25: 1098-1105**

Navarro A, De las Heras B, Villar A (2001)

“Anti-inflammatory and immunomodulating properties of a sterol fraction from *Sideritis foetens* Clem.”

***Biol. Pharm. Bull.* 24: 470-473**

Nores MM, Courrèges MC, Benencia F, Coulombié FC (1997)

“Immunomodulatory activities of *Cedrela lilloi* and *Trichilia elegans* aqueous leaf extracts”

***J. Ethnopharmacol.* 55: 99-106**

Nishizuka Y (1984)

“The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion”

***Nature* 308: 693-698**

Ohnishi M, Morishita H, Toda S, Yase Y, Kido R (1998)

“Inhibition *in vitro* linoleic acid peroxidation and haemolysis by caffeoyltryptophan”

***Phytochemistry* 47: 1215-1218**

Osada Y, Tsuchimoto M, Fukushima H, Takahashi K, Kondo S, Hasegawa M, Komoriya K (1993)

“Hypouricemic effect of the novel xanthine oxidase inhibitor, TEI-6720, in rodents”

***Eur. J. Pharmacol.* 241: 183-188**

- Peluso G, De Feo V, De Simone F, Bresciano E, Vuotto ML (1995)  
“Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production”  
*J. Nat. Prod.* **58**: 639-646
- Polunin O (1982)  
**Guía de campo de las flores de Europa.** Omega, Barcelona, p 504
- Pompella A, Maellaro E, Casini A, Ferrali M, Ciccoli L, Comporti M (1987)  
“Measurement of lipid peroxidation *in vivo*: a comparison of different procedures”  
*Lipids* **22**: 206-211
- Pongprayoon U, Baeckstrom P, Jacobsson U, Lindstrom M, Bohlin L (1992)  
“Antispasmodic activity of beta-damascenone and E-phytol isolated *from Ipomoea pescaprae*”  
*Planta Med.* **58**: 19-21
- Prieto JM (2001)  
“Efectos de plantas antiinflamatorias en la función leucocitaria y procesos biooxidativos”, Tesis doctoral, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.
- Proksch P, Rodríguez E (1983)  
“Chromones and benzofurans of the Aseraceae, their chemistry and biological significance”  
*Phytochemistry* **22**: 2235-2248

- Rajab MS, Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH (1998)  
“Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives: a preliminary structure-activity study”  
*Planta Med.* **64**: 2-4
- Recio MC, Giner RM, Terencio MC, Sanz MJ, Ríos JL (1991)  
“Antiinflammatory activity of *Helichrysum stoechas*”  
*Planta Med.* **57** Suppl. 2: A 56
- Recio MC, Giner RM, Uriburu L, Máñez S, Cerdá M, De la Fuente JR, Ríos JL (2000)  
“*In vivo* activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation”  
*Life Sci.* **66**: 2509-2518
- Resch M, Steigel A, Chen ZL, Bauer R (1998)  
“5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-1 inhibitory active compounds from *Atractylodes lancea*”  
*J. Nat. Prod.* **61**: 347-350
- Ríos JL, Recio MC, Máñez S, Giner RM (2000)  
“Natural triterpenoids as antiinflammatory agents”. En: **Studies in natural products chemistry: Bioactive natural products**. (Atta-Ur-Rahman Ed), vol. 22 part C, Elsevier, Amsterdam, pp 93-143
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK (1993)  
**Immunology**, 3<sup>th</sup> ed., Mosby-Year Book Europe Limited, London

- Romanova D, Vachalkova A, Cipak L, Ovesna Z, Rauko P (2001)  
“Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA protective method”  
*Neoplasma* **48**: 104-107
- Saccani A, Saccani S, Orlando S, Sironi M, Bernasconi S, Ghezzi P, Matovani A, Sica A (2000)  
“Redox regulation of chemokine receptor expression”  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 2761-2766
- Safayhi H, Sailer ER, Ammon HPT (1995)  
“Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid”  
*Mol. Pharmacol.* **47**, 1212-1216
- Sala A (2001)  
“Principios antiinflamatorios y antioxidantes de *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don”, Tesis doctoral, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.
- Santos AR, Niero R, Filho VC, Yunes RA, Pizzolatti MG, Delle Monache F, Calixto JB (1995)  
“Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice”  
*Planta Med.* **61**: 329-332
- Sanz MJ, Ferrándiz M, Cejudo M, Terencio MC, Gil B, Bustos G, Úbeda A, Gunasegaran R, Alcaraz MJ (1994)  
“Influence of series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress”  
*Xenobiotica* **24**: 689-699

Shimizu M, Shogawa H, Matsuzawa T, Yonezawa S, Hayashi T, Arisawa M, Suzuki S, Yoshizaki M, Morita N, Ferro E, et al. (1990)

“Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. IV. Constituents and anti-inflammatory effect of Paraguayan crude drug “alhucema” (*Lavandula latifolia*)”

*Chem. Pharm. Bull.* **38**: 2283-2284

Slater TF, Sawyer BC (1971)

“The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reaction in rat liver fractions *in vitro*”

*Biochem. J.* **123**: 805-814

Slater TF, McDonald-Gibson RG (1987)

“Introduction to the eicosanoids”. En: **Prostaglandins and related substances, a practical approach** (Benedetto C, McDonald-Gibson RG, Nigam S, Slater TF Eds.), IRL Press, Oxford, pp 1-4

Steinhilber D (1994)

“5-Lipoxygenase enzyme expression and regulation of activity”

*Pharm. Acta Helv.* **69**: 3-14

Tak PP, Firestein GS (2001)

“NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases”

*J. Clin. Invest.* **107**: 7-11

Tanaka S, Uno C, Akimoto M, Tabata M, Honda C, Kamisako W (1991)

“Anti-allergic effect of Bryonolic acid from *Luffa cylindrica* cell suspension cultures”

*Planta Med.* **57**: 527-530

Tutin TG, Heywood VH, Burgess NA, More DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (1976)

**Flora Europaea**, vol. IV, Cambridge University, Cambridge, p 133

Wattanapitayakul SK, Bauer JA (2001)

“Oxidative pathways in cardiovascular disease. Roles, mechanisms and therapeutic implications”

**Pharmacol. Ther.** **89**: 187-206

Weiss SJ (1989)

“Tissue destruction by neutrophils”

**New England J. Med.** **320**: 365-376

Werz O, Szellas D, Henseler M, Steinhilber D (1998)

“Nonredox 5-lipoxygenase inhibitors require glutathione peroxidase for efficient inhibition of 5-lipoxygenase activity”

**Mol. Pharmacol.** **54**: 445-451

Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR (1993)

“Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction”

**Br. Med. Bull.** **49**: 506-522

Wise BC, Kuo JF (1983)

“Modes of inhibition by acylcarnitines, adriamycin and trifluoperazine of cardiac phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase”

**Biochem. Pharmacol.** **32**: 1259-1265

Wu F, Cao J, Jiang J, Yu B, Xu Q (2001)

“Ruscogenin glycoside (Lm-3) isolated from *Liriope muscari* improves liver injury by dysfunctioning liver-infiltrating lymphocytes”

***J. Pharm. Pharmacol.* 53: 681-688**

Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economon M, Fotsis T, Roussos C (2001)

“Luteolin inhibits endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages”

***J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296: 181-187**

Yamanaka N, Oda O, Nagao S (1997)

“Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu<sup>2+</sup>-induced low density lipoprotein oxidation”

***FEBS Lett.* 405: 186-190**

Yim TK, Wu WK, Pak WF, Ko KM (2001)

“Hepatoprotective action of an oleanolic acid-enriched extract of *Ligustrum lucidum* fruits is mediated through an enhancement on hepatic glutathione regeneration capacity in mice”

***Phytother. Res.* 15: 589-592**

Zdero C, Bohlmann F, Anderberg AA (1991)

“Leysseral derivatives from *Anisothrix integra* and *Phagnalon purpurescens*”

***Phytochemistry* 30: 3009-3011**

## **ANEXO**

ARTÍCULO 1

**“On the activity of trifluoperazine and palmitoylcarnitine in mice:  
delayed hypersensitivity models”**

*Life Sciences* 66: 183-188 (2000)



*PHARMACOLOGY LETTERS*  
*Accelerated Communication*

**ON THE ACTIVITY OF TRIFLUOPERAZINE AND PALMITOYL CARNITINE IN MICE:  
DELAYED HYPERSENSITIVITY MODELS**

Luis Góngora, Salvador Máñez, Rosa M. Giner, M. Carmen Recio and José-Luis Ríos

Departament de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València,  
Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot (València) Spain

(Submitted July 29, 1999; accepted September 27, 1999;  
received in final form November 5, 1999)

**Abstract.** The effect of pre- and post-challenge treatments with trifluoperazine and palmitoylcarnitine, two protein kinase C (PKC) inhibitors characterised by their interaction with the phospholipid enzyme cofactor, on the inflammation caused by delayed hypersensitivity (DTH) to dinitrofluorobenzene (DNFB) and sheep red blood cells (SRBC) in mice is reported. The activity of dexamethasone and two immunosuppressors, azathioprine and methotrexate, is also evaluated. The effectiveness of pre-treatment with each of the test drugs diminished when the DNFB challenge dose increased, whereas trifluoperazine and azathioprine were more active when administered after the challenge at the high DNFB dose. Trifluoperazine, which is also a calmodulin-antagonist, was the more effective of the PKC inhibitors tested on DNFB-DTH (39% and 59% inhibition swelling 24 and 96 h after challenge, respectively). SRBC-DTH was sensitive only to the action of the drugs given after challenge. In this test, PKC inhibitors showed a moderate effect, in the same range as methotrexate, whereas dexamethasone suppressed the reaction. The ability of trifluoperazine in inhibiting cutaneous DTH reaction, depending on the treatment schedule and the hapten challenge dose, has been determined. © 2000 Elsevier Science Inc.

**Key Words:** PKC inhibitors, trifluoperazine, palmitoylcarnitine, delayed hypersensitivity

### Introduction

A delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction is an expression of cell-mediated immunity and plays a major role in the pathology and chronicity of many inflammatory disorders. One of the most characteristic DTH phenomenon is contact hypersensitivity, in which a hapten reacts covalently with proteins to lead to an antigen-protein complex that is a target for T-lymphocytes. The cells that recognize this complex in the skin are the Langerhan cells (LCs). They are dendritic antigen-presenting cells in the epidermis that express CD1 antigen, the class II major histocompatibility complex (MHC)-encoded glycoproteins and Fc and complement receptors. LCs migrate to lymph nodes, where the antigen is recognised by CD4<sup>+</sup> lymphocytes that become memory cells. After a second contact with the hapten, an inflammatory reaction appears, caused by the release of cytokines such as IL-2, IL-3, GM-CSF and IFN $\gamma$  as well as by T-lymphocyte proliferation (1). It has recently been suggested that the effectors of contact sensitivity are T cells of the CD8<sup>+</sup> phenotype and that CD4<sup>+</sup> cells exert downregulatory activity (2). One classic form of the DTH inflammatory reaction mediated by MHC class II-restricted CD4<sup>+</sup> is that caused by subcutaneous injection of sheep red blood cells (SRBC) (2). Depending on the immunization procedure, different mechanisms such as the classic tuberculin or delayed Arthus reactions have been shown to participate (3).

Prof. J.L. Ríos, Departament Farmacologia, Fac. Farmàcia, Univ. València, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot (València) Spain. Tel.: 0034963864973, Fax: 0034963864943. Email: riosjl@uv.es

Contact sensitizers applied to mouse skin induce LCs migration from epidermis to lymph nodes, thus initiating a specific immune response. Halliday and Lucas (4) demonstrated that protein kinase C (PKC) is the main signal transduction mechanism leading to this LCs migration; they found that topical application on mouse skin of analogues of the physiological activator of PKC, diacylglycerol, caused depletion of epidermal LCs. New studies on the physiology of LCs have demonstrated their pivotal role in the development of DTH in the skin, mainly through the expression of PKC- $\beta_2$ , whose selective localisation in LCs and high sensitivity to downregulation have been reported (5). For these reasons, it is supposed that topical application of PKC inhibitors probably suppresses LCs migration and hence the induction of immune response in the skin.

In the present study we have used pre- and post-challenge treatment to compare the effects of two phospholipid-interacting PKC inhibitors, palmitoylecarnitine, a metabolic intermediate of long-chain fatty acids synthesis, and trifluoperazine, a phenothiazine dual PKC inhibitor / calmodulin antagonist, on DTH reactions to DNFB and SRBC in mice. To determine the relative efficacy of these compounds, we also studied the effects of two immunosuppressants azathioprine and methotrexate, as well as the glucocorticoid dexamethasone.

### Methods

*Animals.* Groups of six female Swiss mice, 8-10 weeks old, were used. All the animals were fed a standard diet *ad libitum*. Housing conditions and experimental procedures were in accordance with the European Union regulations on the use of animals for scientific purposes (CEE Council 86/609).

*Chemicals.* 2,4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB), azathioprine, methotrexate, palmitoylecarnitine chloride, trifluoperazine, dexamethasone and sheep red blood cells (SRBC) were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis.

*2,4-Dinitro-1-fluorobenzene-induced delayed type hypersensitivity (DNFB-DTH).* The sensitization phase was induced by topical application of 20  $\mu$ L of 0.2% (v/v) DNFB in acetone onto the shaved abdomen on days 0 and 1 (total 80  $\mu$ g). To elicit DTH reactions, the animals were challenged by application of 10 or 20  $\mu$ L of 0.2% DNFB in acetone (20 or 40  $\mu$ g/ear, respectively) on the inner and outer surfaces of both ears five days after sensitization. Primary reaction was induced by topical application of 20 or 40  $\mu$ g/ear of DNFB on both ears in unsensitized mice. The ear swelling reaction was assessed 24 and 96 h after each challenge by measuring ear thickness with a micrometer (Mitutoyo). The edema was calculated for each ear as the difference in thickness before treatment and 24 and 96 h after challenge. Azathioprine, trifluoperazine, palmitoylecarnitine (0.5 mg/ear) and methotrexate (0.1 mg/ear) in EtOH/H<sub>2</sub>O (8:2), and dexamethasone (0.05 mg/ear) in acetone, were applied topically (20  $\mu$ L) to the both sides of both ears following two different dosage protocols: a) for three consecutive days (72, 48 and 24 h) prior to challenge; b) 2, 24, 48 and 72 h after challenge.

*Sheep red blood cell-induced delayed hypersensitivity (SRBC-DTH).* SRBC were reconstituted in PBS, washed three times with PBS by centrifugation and kept in the same medium. Mice were sensitized by injecting subcutaneously  $2 \times 10^7$  SRBC in 0.1 mL of PBS into the back on day 0. Five days later, SRBC-immunized mice were challenged by injecting  $1 \times 10^8$  SRBC in 0.025 mL of PBS in the right hind paw; the left hind paw received solvent only. The primary irritation was induced by injecting  $1 \times 10^8$  SRBC without prior sensitization. The thickness of the hind paw was measured with a micrometer 18, 24 and 48 h after challenge. The foot pad reaction was expressed in mm as the difference in thickness between the right pad injected with SRBC and the left with PBS. Azathioprine, trifluoperazine and palmitoylecarnitine (20 mg/kg), methotrexate and dexamethasone (10 mg/kg), dissolved in EtOH/Tween 80/H<sub>2</sub>O (1:1:10), were administered intraperitoneally (0.3 mL) following two different dosage protocols: a) 96 and 24 h prior to challenge; b) immediately before and 16 h after challenge.

*Statistics.* Edemas are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Inhibition percentages arise from the differences between treated and non-treated tissues, and are referred to the control treated only with the DTH inducers. One-way

analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's *t*-test for multiple comparisons of unpaired data was used for statistical evaluation.

### Results

While the sensitization dose was fixed (80  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ), we varied the amount of DNFB at elicitation (20 and 40  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) and found that both doses produced a quantitatively similar reaction, which was maximal 24 h after the challenge. When mice were only challenged with 20 or 40  $\mu\text{g}/\text{ear}$  without prior sensitization very significant differences in ear thickness with respect to the control group (sensitized plus challenged mice) were observed (data not shown). This indicates that the edema caused only by a single DNFB application is negligible. For each dose of DNFB, the drugs were given to the mice after sensitization to examine their effects on the induction phase, or given after challenge to examine their effects on the elicitation phase.

In general, drug response to DTH showed a significant suppressive change in mice that received treatment prior to challenge (induction phase) at the low DNFB dose (20  $\mu\text{g}/\text{ear}$ , Fig. 1a and 2a) and after challenge (elicitation phase) at the high DNFB dose (40  $\mu\text{g}/\text{ear}$ , Fig. 1b and 2b). In the latter conditions, however, palmitoylcarnitine (0.5 mg/ear) and methotrexate (0.1 mg/ear), were not active. When methotrexate was assayed at the same dose as the other drugs (0.5 mg/ear), it markedly inhibited the reaction (62 and 89% inhibition at 24 and 96 h, respectively) but caused appreciable toxicity, characterised by ataxia, hypothermia and death.

In all the protocols, dexamethasone abolished the DTH reaction and even decreased the plain thickness values (Fig. 1, 2), as expected for its wide array of effects on multiple inflammatory mediators (6).

When administered prior to the 20  $\mu\text{g}$  DNFB challenge, palmitoylcarnitine and trifluoperazine significantly inhibited the swelling at 24 h (35% and 39% inhibition, respectively, Fig. 1a). They did not suppress the induction phase to a degree significantly different from the control when 40  $\mu\text{g}$  DNFB challenge was used (Fig. 1b). Azathioprine and methotrexate markedly suppressed the induction phase at the 20  $\mu\text{g}$  DNFB dose (63% and 98% inhibition at 24 h, respectively), but methotrexate was also effective at the 40  $\mu\text{g}$  DNFB dose (Fig. 1).

The elicitation phase was weakly reduced by palmitoylcarnitine at the 20  $\mu\text{g}$  DNFB dose whereas trifluoperazine, though inactive at 24 h, clearly inhibited the reaction at 96 h at this dose (47% inhibition, Fig. 2a), and at 24 and 96 h at the 40  $\mu\text{g}$  DNFB dose (39% and 59% inhibition, respectively, Fig. 2b). In this conditions, azathioprine was notably active (54% and 70% inhibition, Fig. 2b).

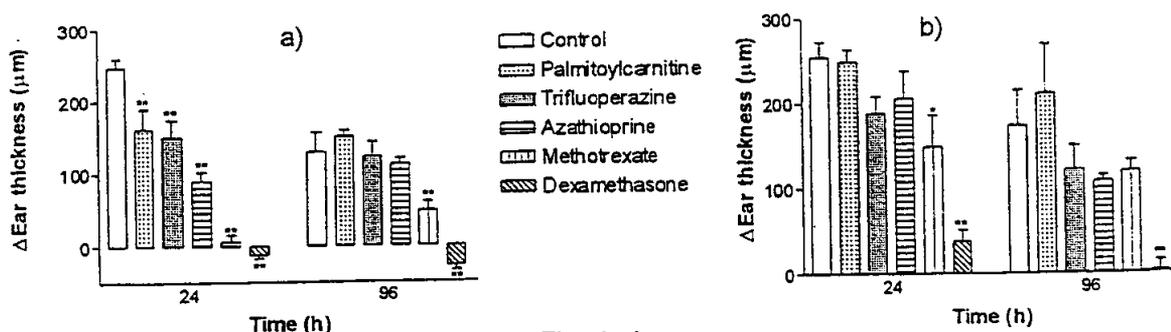


Fig. 1a,b

Effects of drugs administered prior challenge on dinitrofluorobenzene-delayed hypersensitivity, a) 20  $\mu\text{g}/\text{ear}$  DNFB; b) 40  $\mu\text{g}/\text{ear}$  DNFB. Data correspond to the increase in ear thickness ( $\mu\text{m}$ ) and are expressed as mean  $\pm$  s.e.m., \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  Dunnett's *t*-test,  $n = 10$ .

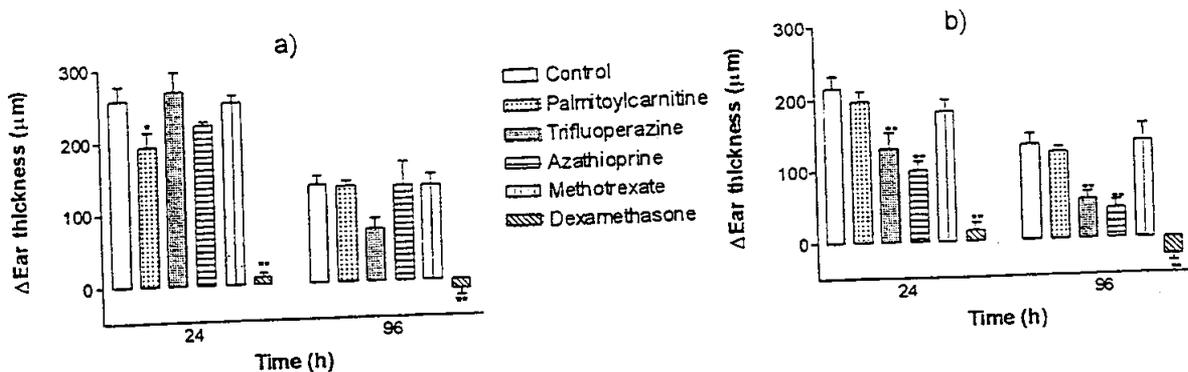


Fig. 2a,b

Effects of drugs administered after challenge on dinitrofluorobenzene-delayed hypersensitivity, a) 20 µg/ear DNFB; b) 40 µg/ear DNFB. Data correspond to the increase in ear thickness (µm) and are expressed as mean ± s.e.m., \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 Dunnett's *t*-test, n = 10.

SRBC-DTH reactions were maximal at 18 h and disappeared at 48 h after the challenge. Reaction to SRBC was practically unchanged when drugs were administered prior to challenge (data not shown), whereas it appeared to be sensitive to the action of the drugs administered immediately before and 16 h after challenge (Fig. 3).

Dexamethasone strongly suppressed the reaction at 18 and 24 h, whereas azathioprine produced a significant reduction in the elicitation phase only at 18 h (56% inhibition). PKC inhibitors had a moderate range of activity similar to that of methotrexate at 24 h (between 35% and 37% inhibition, Fig. 3).

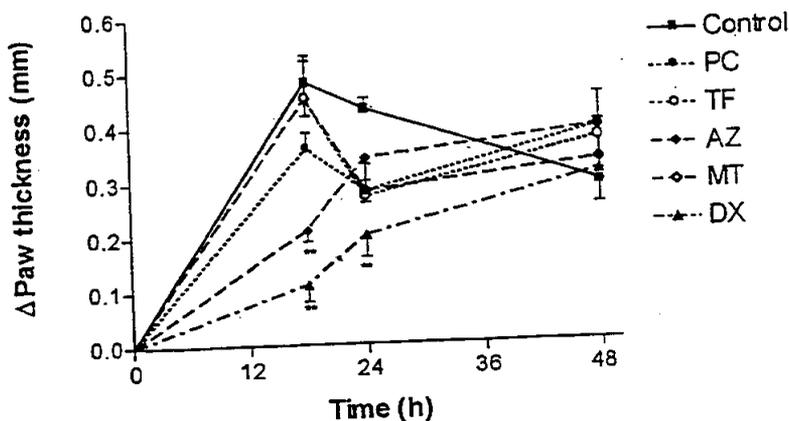


Fig. 3

Effects of trifluoperazine (TF), palmitoylcarnitine (PC) and azathioprine (AZ) at 20 mg/kg and methotrexate (MT) and dexamethasone (DX) at 10 mg/kg on sheep red blood cells-delayed hypersensitivity, injected i.p. immediately before and 16 h after challenge. Data correspond to the increase in paw thickness (mm) and are expressed as mean ± s.e.m., \*\* P < 0.01 Dunnett's *t*-test, n = 5.

Discussion

In spite of the reported effectiveness of very low doses of DNFB in sensitizing mice, we have followed the common practice of using a larger dose of the contact sensitizer DNFB at induction than that at challenge.

After analyzing the results obtained by Brown and Shivji (7), we decided to apply a total dose of 80 µg/shaved abdomen in two consecutive days, which is a sensitizing dose within the plateau near the 50% effect of the dose response curves (10-1500 µg). One of the most commonly used doses is 100 µg twice, although some authors have used 100 µg (8) and 125 µg (9) once. Although for the elicitation of contact sensitivity, two different doses of DNFB (20 and 40 µg/ear) were applied, ear swelling reactions were similar in both experiments, indicating that there is not a dose-related response within this range.

Due to its ability to interact with calmodulin, the antipsychotic drug trifluoperazine is an inhibitor of several Ca<sup>2+</sup>-dependent enzymes. Although PKC, a family of proteins whose phosphorylating activity was formerly established to depend on phospholipids and Ca<sup>2+</sup>, is not a calmodulin-sensitive kinase, trifluoperazine is indeed recognised as a bovine heart-PKC inhibitor that behaves in a competitive fashion with respect to phosphatidylserine. The fact that trifluoperazine inhibited PKC also competitively to Ca<sup>2+</sup>, suggest an additional *direct* site of inhibition on the enzyme, apart from the confirmed interaction with phospholipids (10). Comparison of the effects of trifluoperazine on intact and cleaved PKC has demonstrated that its potency in interacting with the catalytic site of the enzyme is 2-3 times smaller than its potency observed against the intact protein (11).

PKC inhibitors such as palmitoylecarnitine blocked depletion of epidermal LCs. Although palmitoylecarnitine is not structurally related to trifluoperazine, it shares the biological property of being a PKC inhibitor. The amphiphilic character of palmitoylecarnitine is not the only feature that leads to an inhibition of PKC, given that this substance is more effective in a dose-dependent manner than other related acylcarnitines such as linoleoylecarnitine or hexanoylecarnitine. This suggests that a fatty chain length of 16 is optimal for the stoichiometric interaction with phosphatidyl serine (10, 12).

In our experiments, treatment with trifluoperazine always produced much higher effects than those of the other PKC inhibitor, palmitoylecarnitine, except in the case of the treatments with the 20 µg challenge after 24 h. Although in the 20 µg pre-challenge treatment each of the drugs showed significant percentages of swelling inhibition after 24 h, blocking DNA synthesis with antimetabolites (azathioprine and methotrexate) prior to the elicitation caused a stronger reduction of the DTH reaction than that observed when PKC inhibitors were applied. This comparison is even more favourable in the case of methotrexate, given that it was administered at a fifth of the dose of the other non-steroidal drugs. However, trifluoperazine surpassed the effects of the antimetabolites in the late edema measurement (96 h) after its post-challenge application against 20 µg DNFB. When the dose of DNFB was twice as high (40 µg), the effects of both trifluoperazine and azathioprine appeared to be astonishingly higher, as if the local response to higher concentrations of DNFB potentiate the effects of calmodulin antagonists or purine synthesis inhibitors. Since methotrexate produced appreciable anti-inflammatory activity only when administered prior to the challenge, it may be effective against the antigen presentation and oligoclonal T-cell response, but it would not inhibit the synthesis and release of chemokines and adhesion molecules which are involved in the elicitation phase (2). Each of these hypotheses requires further assessment.

The mild effects of both PKC inhibitors on SRBC-DTH inflammation increase moderately throughout the time until 24 h, whereas the profile of the more powerful drugs (azathioprine and dexamethasone) is quite different because they reach their maximum effect at 18 h. This result allows us to suggest that PKC activation would not greatly participate in this reaction in the first hours after challenge.

As to the effect of trifluoperazine, our findings suggest that its anti-inflammatory effect after repeated topical applications, which is observable at the 96 h measurement, relates to the calmodulin antagonism as a result of the influence of cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels in the skin DTH response. To this regard, it should be pointed out that nifedipine, a Ca<sup>2+</sup> channel blocker, has shown inhibitory effect on oxazolone-induced sensitivity (13). Trifluoperazine has also been described as an inhibitor of the expression phase of the sensitivity and suppressor of the passive cellular transfer and DNA synthesis in the draining lymph node cells when oxazolone was used as an inductor of contact DTH (14). In a study designed to ascertain to what extent dopamine-D<sub>2</sub> antagonism is related to the effects of trifluoperazine and congeners on immunity, a series of antidopaminergic drugs were evaluated. The phenothiazines trifluoperazine and chlorpromazine inhibited paw-DTH induced by picryl chloride, the graft-versus-host phenomenon and mitogen-induced

lymphocyte proliferation, whereas other potent D<sub>2</sub> antagonists like haloperidol and sulpiride were ineffective (15).

Although according to Halliday and Lucas, palmitoylcarnitine is not effective against inflammation caused by DTH, we assayed it under different conditions to determine whether the absence of activity is due to the one-dose administration protocol (4). However, the repeated treatment with palmitoylcarnitine after our experiments has also failed to give satisfactory results.

In conclusion, it is established that topically applied trifluoperazine behaves as an inhibitor of the inflammation caused by DTH with an efficacy similar to that of immunosuppressors such as azathioprine, depending on the experimental conditions. Although palmitoylcarnitine has shown minor effects, further studies on newer drugs of this kind are needed to determine the role of PKC inhibitors on the control of DTH manifestations.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministerio de Educación y Cultura (DGICYT grant PM95-0150).

#### References

1. I.M. ROITT, J. BROSTOFF and D.K. MALE, *Immunology* 3<sup>rd</sup>ed., Mosby-Year Book Europe Limited, London, (1993).
2. S. GRABBE and T. SCHWARZ, *Immunology Today* 19, 37-44 (1998).
3. B. HURTREL, M.A. MAIRE, M. HURTREL and P.H. LAGRANGE, *Cell Immunol.* 142, 252-263 (1992).
4. G.M. HALLIDAY and A.D. LUCAS, *Immunology* 79, 621-626 (1993).
5. A.L. GOODELL, H.S. OH, S.A. MEYER and R.C. SMART, *J. Invest. Dermatol.* 107, 354-359 (1996).
6. P.J. BARNES and I. ADCOCK, *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 436-441 (1993).
7. W.R. BROWN and G.M. SHIVJI, *Acta Dermatol. Venereol. (Stockh.)* 71, 44-47 (1991).
8. S. KONDO, R.C. MCKENZIE and D.N. SAUDER, *J. Invest. Dermatol.* 811-814 (1994).
9. E. KODARI, A. PAVONE and J. REINERS Jr, *Carcinogenesis* 12, 1933-1937 (1991).
10. B.C. WISE and J.F. KUO, *Biochem. Pharmacol.* 32, 1259-1265 (1983).
11. T. NAKADETE, A.Y. JENG and P.M. BLUMERG, *Biochem. Pharmacol.* 37, 1541-1545 (1988).
12. G. VESCOVI, B. WEBER, M. MATRAT, C. RAMACCI, P. NABET and B. KREMER, *Br. J. Dermatol.* 119, 171-178 (1988).
13. Q. CORTEZA, S. SHEN, D. REVIE and P. CHRETIEN, *Transplantation* 47, 339-342 (1989).
14. G. ANTONELLI, M. SANTIANO, P. ROMANO, V. COLIZZI and F. DIANZANI, *Int. J. Immunopharmacol.* 9, 237-241 (1987).
15. R.E. ROUDEBUSH, P.L. BERRY, N.K. LAYMAN, L.D. BUTLER and H.U. BRYANT, *Int. J. Immunopharmacol.* 13, 961-968 (1991).

ARTÍCULO 2

**“New prenylhydroquinone glycosides from *Phagnalon rupestre*”**

***Journal of Natural Products* 64: 1111-1113 (2001)**

New Prenylhydroquinone Glycosides from *Phagnalon rupestre*

Luis Góngora, Rosa-María Giner, Salvador Máñez, María del Carmen Recio, and José-Luis Ríos\*

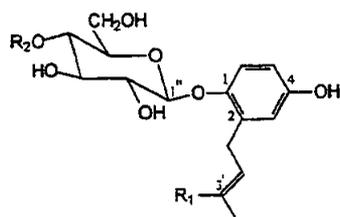
Departament de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100-Burjassot, València, Spain

Received March 29, 2001

Three new hydroquinone glycosides were isolated from the MeOH extract of the aerial parts of *Phagnalon rupestre*. Their structures were elucidated as 1-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3',3'-dimethylallyl)-benzene (1), 1-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3'-hydroxymethyl-3'-methylallyl)benzene (2), and 1-*O*-(4''-*O*-caffeoyl)- $\beta$ -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3',3'-dimethylallyl)benzene (3) by spectroscopic methods.

The genus *Phagnalon* (Asteraceae) is represented by 30 Eurasian species, six of which are typical of the European Mediterranean region.<sup>1,2</sup> The phytochemistry of *Phagnalon rupestre* is not well known, although some studies have revealed the presence of flavonoids such as apigenin, apigenin 7-glucoside and luteonin,<sup>3</sup> quinones,<sup>4</sup> fatty substances such as *n*-octadecane, trimethyl-dodecane, and other *n*-paraffin components, and essential oil constituents such as  $\alpha$ -terpineol, thymol, and hexahydrofarnesyl acetone.<sup>5,6</sup>

The bark of *Phagnalon rupestre* is widely used to induce deliberate burns for the healing of various ailments,<sup>7</sup> and some extracts of this plant have been shown to possess antimicrobial properties.<sup>8</sup> On the other hand, the naturally occurring quinones present in *Phagnalon* sp. can act as contact allergens.<sup>4</sup>



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
(1)	CH <sub>3</sub>	H
(2)	CH <sub>2</sub> OH	H
(3)	CH <sub>3</sub>	caffeoyl

Air-dried and powdered aerial parts of *P. rupestre* were macerated with MeOH, and the resulting extract was liquid-liquid partitioned with solvents of increasing polarity. After gel filtration followed by vacuum liquid chromatography (VLC) and low-pressure liquid chromatography three compounds (1–3) were isolated from the ethyl acetate fraction. The least polar of them, compound 1, was analyzed for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub> (FABMS) and showed ions at *m/z* 340 [M]<sup>+</sup> and *m/z* 363 corresponding to [M + Na]<sup>+</sup>. The <sup>1</sup>H NMR spectrum displayed the signal pattern typical of an alkylhydroquinone.<sup>9</sup> Three aromatic protons (H-3, H-5, and H-6) exhibited an ABX system ( $\delta$  6.55, 6.52, and 6.98, respectively), one olefinic proton at  $\delta$  5.30, two aliphatic protons at  $\delta$  3.43, and two methyl groups at  $\delta$  1.70 and 1.73 arising

from a prenyl residue. An anomeric proton at  $\delta$  4.71 and two double doublets at 3.66 and 3.85 indicated the presence of a  $\beta$ -glucopyranose residue (see Table 1). This was confirmed by analysis of the <sup>13</sup>C NMR spectrum, which exhibited 17 carbon signals, 11 corresponding to the aglycone and six to the sugar moiety. A NOE experiment showed correlations between H-1' and H-1'' and between H-6 and H-1'', thus making it possible to confirm the locations of the prenyl and sugar residues. The structure of 3 was elucidated to be 1-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3',3'-dimethylallyl)benzene. Full assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR signals were accomplished using NOE experiments (Tables 1 and 2).

Compound 2 (C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>) possessed one more oxygen than compound 1. The <sup>13</sup>C NMR spectrum of 2 was similar to that of 1, with the only difference arising from the appearance of a -CH<sub>2</sub>OH carbon signal at  $\delta$  68.8 in 2 together with the absence of one of the two signals corresponding to a methyl group in 1. This oxymethylene group was placed at C-4', as shown by the upfield shift of C-5' ( $\delta$  13.9) and the presence of a carbinolic proton signal at  $\delta$  3.85 (Tables 1 and 2). Thus 2 was identified as 1-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3'-hydroxymethyl-3'-methylallyl)benzene.

Compound 3 gave an ion in the FABMS at *m/z* 525 [M + Na]<sup>+</sup>, suggesting the molecular formula C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>O<sub>10</sub>. An intensive fragment ion at *m/z* 325 indicated the loss of a caffeoyl moiety. The <sup>1</sup>H spectrum showed an ABX pattern proton signal at  $\delta$  7.05, 6.76, and 6.93 and two olefinic protons at  $\delta$  6.27 and 7.57. The <sup>13</sup>C NMR spectrum showed one carbonylic signal at  $\delta$  168.5, two olefinic carbons at  $\delta$  114.6 and 147.6, and six aromatic carbons, two of them hydroxylated ( $\delta$  149.6 and 146.7). These signals indicated one caffeoyl moiety. Comparison of the sugar signals in the <sup>13</sup>C NMR spectrum of 3 with data on compounds 1 and 2 allowed identification of a 4''-*O* substitution on the glucose residue. The C-4 signal of the sugar at  $\delta$  72.2 was 0.8 ppm downfield from that of compound 1, and C-3 and C-5 were shifted upfield (Tables 1 and 2). The structure of 3 was identified as 1-*O*-(4''-*O*-caffeoyl)- $\beta$ -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3',3'-dimethylallyl)benzene.

To our knowledge, this is the first report of the occurrence of the simplest dimethylallyl-hydroquinone in glycosidic form. The sugar moiety appears to stabilize the molecule, indirectly preventing dehydrogenation to give the analogue prenyl-benzoquinone, which had previously been identified in the plant. Closely related to *Phagnalon* phenolics are some biologically active hydroquinone deriva-

\* To whom correspondence should be addressed. Tel and fax: +34 96 3864973. E-mail: riosjl@uv.es.

**Table 1.**  $^1\text{H}$  NMR Spectral Data ( $\delta$ ) of Compounds 1, 2, and 3 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ : 400 MHz)<sup>a</sup>

H	1	2	3
3	6.55 (1H, d, $J = 2.8$ )	6.47 (1H, d, $J = 2.8$ )	6.56 (1H, d, $J = 2.7$ )
5	6.52 (1H, dd, $J = 8.6, 2.8$ )	6.43 (1H, dd, $J = 8.8, 2.8$ )	6.52 (1H, dd, $J = b, 3$ )
6	6.98 (1H, d, $J = 8.4$ )	6.88 (1H, d, $J = 8.4$ )	7.01 (1H, d, $J = 8.4$ )
1'	3.43 (2H, d, $J = 7.6$ )	3.32 (2H, d, $J = 7.6$ )	3.57 (2H, d, $J = 7.5$ )
2'	5.30 (1H, t, $J = 7.6$ )	5.47 (1H, t, $J = 7.2$ )	5.30 (1H, t, $J = 7.5$ )
4'	1.70 (3H, s)	1.64 (3H, s)	1.70 (3H, s)
5'	1.73 (3H, s)	3.85 (2H, s)	1.72 (3H, s)
1''	4.71 (1H, d, $J = 7.6$ )	4.64 (1H, d, $J = 7.2$ )	4.79 (1H, d, $J = 7.5$ )
2'', 3''	3.32–3.37 (2H, m)	3.24–3.36 (4H, m)	3.31–3.37 (2H, m)
4''	3.29 (1H, m)	3.24–3.36 (4H, m)	3.30 (1H, m)
5''	3.40 (1H, m)	3.24–3.36 (4H, m)	3.53 (1H, m)
6''	3.66 (1H <sub>a</sub> , dd, $J = 12, 4.8$ ) 3.85 (1H <sub>b</sub> , dd, $J = 11.4, 2$ )	3.57 (1H <sub>a</sub> , dd, $J = 11.6, 5.2$ ) 3.75 (1H <sub>b</sub> , dd, $J = 11.6, 1.6$ )	3.62–3.75 (2H, m)
2'''			6.27 (1H, d, $J = 15.9$ )
3'''			7.57 (1H, d, $J = 15.9$ )
5'''			7.05 (1H, d, $J = 1.9$ )
8'''			6.76 (1H, d, $J = 7.8$ )
9'''			6.93 (1H, broad doublet)

<sup>a</sup> Coupling constants (Hz) are in parentheses. <sup>b</sup> Overlapped.

**Table 2.**  $^{13}\text{C}$  NMR Spectral Data ( $\delta$ ) of Compounds 1, 2, and 3 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ : 100 MHz)

C	1	2	3
1	150.0	150.1	150.0
2	133.9	133.4	134.0
3	113.8	114.0	113.8
4	153.5	153.6	153.6
5	116.8	118.4	116.8
6	118.3	117.0	118.5
1'	29.1	29.0	29.1
2'	123.9	125.2	123.9
3'	133.2	136.6	133.2
4'	17.9	68.8	17.9
5'	25.9	13.9	25.9
1''	103.9	103.9	103.9
2''	75.0	75.0	75.2
3''	78.1	78.1	75.9
4''	71.4	71.3	72.2
5''	77.9	77.9	76.0
6''	62.5	62.5	62.2
1'''			168.5
2'''			114.6
3'''			147.6
4'''			127.6
5'''			115.1
6'''			149.6
7'''			146.7
8'''			116.4
9'''			123.0

tives bearing polyisoprene, often hydroxylated, chains of variable length that have been reported from marine sponges, e.g., *Ircinia* sp.<sup>10</sup> Avarol from *Disidea avara*<sup>11</sup> and siphonodictyal from *Siphonodictyon coralliphagum*<sup>12</sup> possess a hydroquinone nucleus bound to a bicyclic terpenoid moiety. Other related compounds such as the heptadecenylhydroquinones from *Tapirira guaianensis* (Anacardiaceae)<sup>9</sup> and glaziopianol from *Auxemma glaziioviana* (Boraginaceae)<sup>13</sup> have been identified in higher plants.

## Experimental Section

**General Experimental Procedures.** NMR spectra were run on a 400 MHz ( $\delta$ , ppm) Bruker AMX instrument in  $\text{CD}_3\text{OD}$ . FABMS were carried out in a VG Auto Spec (Fisons). Optical rotations were measured with a Perkin-Elmer 241 polarimeter. UV spectra were obtained on a Shimadzu UV-2101 PC spectrophotometer. IR spectra were obtained using KBr disks on a Mattson Satellite FTIR spectrophotom-

eter. Analytical TLC was carried out on Merck Si gel F<sub>254</sub> and RP-18 aluminum sheets visualized with 1% sulfuric acid-anisaldehyde.

**Plant Material.** The flowering aerial parts of *Phagnalon rupestre* (L.) DC. were collected in Sierra de Corbera (Valencia, Spain). A voucher specimen (DF7) of the plant is kept in the Department of Pharmacology, University of Valencia.

**Extraction and Isolation.** The air-dried, powdered aerial part of *P. rupestre* (660 g) was extracted by stirring with MeOH (4 × 2 L) for 24 h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure. The methanolic extract (100.0 g) was suspended in H<sub>2</sub>O and fractionated with EtOAc to obtain the extract (17.8 g). This EtOAc extract was filtered over Sephadex LH-20 with MeOH to yield 12 fractions. The fourth fraction (3.8 g) was subjected to VLC on a Si gel 60 (Merck) column and eluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH mixtures and MeOH. The fraction eluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (9:1) (fraction IV-6) was rechromatographed on a Lobar B column of RP-18 (Merck) with MeOH-H<sub>2</sub>O (6:4), and 1 (1.2 g) was obtained from the fifth fraction. Fraction IV-7 was chromatographed using Si gel 60 with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (9:1) to yield 2 (8 mg). Fractionation of the sixth fraction (0.9 g) over Si gel with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH mixtures followed by purification on a Lobar B column of Si gel (Merck) with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (95:5) gave 3 (50 mg).

**1-O- $\beta$ -Glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3',3'-dimethylallyl)benzene (1):** amorphous powder,  $[\alpha]_D -58^\circ$  (MeOH;  $c$  0.1); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 289, 232 nm. (+NaOH) 304, 243 nm; IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3400, 2973, 2928, 2907, 1644, 1606;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, Tables 1 and 2; FABMS  $m/z$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  363,  $[\text{M}]^-$  340,  $[\text{glucopyranoside}]^+$  180.

**1-O- $\beta$ -Glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3'-hydroxy-methyl-3'-methylallyl)benzene (2):** amorphous powder,  $[\alpha]_D -34^\circ$  (MeOH;  $c$  0.1); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 293, 231 nm. (+NaOH) 306, 226; IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3400, 2926, 2856, 1731, 1637;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, Tables 1 and 2; FABMS  $m/z$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  379,  $[\text{M}]^-$  356.

**1-O-(4'-O-Caffeoyl)- $\beta$ -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3',3'-dimethylallyl)benzene (3):** amorphous powder,  $[\alpha]_D -26^\circ$  (MeOH;  $c$  0.1); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 331, 242 nm. (+NaOH) 380, 311, 238 nm; IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3400, 2925, 2856, 1694;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, Tables 1 and 2; FABMS  $m/z$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  525,  $[\text{M}]^-$  502,  $[\text{M} - \text{caffeoyl} + 2\text{H}]^-$  325.

**Acknowledgment.** This work was supported by the Secretaria de Estado de Universidades e Investigación of the Spanish Government (grant PM98-0206). The authors thank Dr. A. Braca (University of Pisa, Italy) for her punctual help on the structural identification.

## References and Notes

- (1) Tutin, T. G.; Heywood, V. H.; Burgess, N. A.; More, D. M.; Valentine, D. H.; Walters, S. M.; Webb, D. A. *Flora Europaea*; Cambridge University: Cambridge, 1976; Vol. 4, p 133.
- (2) Engler A. *Syllabus der Pflanzenfamilien*. Gebrüder Bornträger: Berlin, 1964; Part II, p 489.
- (3) Dolci, M.; Tira, S. *Atti Accad. Sci. Torino, Cl. Sci. Fis., Mater. Nat.* **1982**, *116*, 315–318.
- (4) Hausen, B. M.; Schulz, K. H. *Pflanzl. Med.* **1977**, *32*, 287–293.
- (5) Bicchi, C.; Nano, G. M.; Tira, S. *Pflanzl. Med.* **1975**, *28*, 389–391.
- (6) Bicchi, C.; Frattini, C.; Nano, G. M.; Tira, S. *Relata Technol.* **1979**, *11*, 64.
- (7) Friedman, J.; Yaniv, Z.; Dafni, A.; Palewitch, D. *J. Ethnopharmacol.* **1986**, *16*, 275–287.
- (8) Ali-Shtayeh, M. S.; Yaghmour, R. M.; Faidi, Y. R.; Salem, K.; Al-Nuri, M. A. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *60*, 265–271.
- (9) David, J. M.; Chávez, J. P.; Chai, H. B.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 287–289.
- (10) Gil, B.; Sanz, M. J.; Terencio, M. C.; De Giulio, A.; De Rosa, S.; Alcaraz, M. J.; Payá, M. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *285*, 281–288.
- (11) Minale, L.; Riccio, R.; Sodano, G. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *38*, 3401–3404.
- (12) Kilday, K. B.; Wright, A. E.; Jackson, R. H.; Sills, M. A. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 958–960.
- (13) Da Costa, G. M.; de Lemos, T. L. G.; Pessoa, O. D. L.; Monte, F. J. Q.; Braz-Filho, R. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1044–1045.

NP010166T

ARTÍCULO 3

***“Phagnalon rupestre as a source of compounds active  
on contact hypersensitivity”***

*Planta Medica* (2002, en prensa)

## Phagnalon rupestre as a Source of Compounds Active on Contact Hypersensitivity

Luis Góngora, Rosa María Giner, Salvador Máñez, María del Carmen Recio, José Luis Ríos

### Abstract

The effect of *Phagnalon rupestre* MeOH extract on dinitrofluorobenzene- and sheep red blood cells-induced hypersensitivity was investigated. Eight compounds were identified: three dimethylallyl-hydroquinone glucosides (1–3), 3,5- and 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl esters (4 and 5), their free carboxyl analogues (6 and 7), and luteolin 7-*O*- $\beta$ -glucoside (8). All were tested for dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity inhibitory activity. Flavonoid 8 was the most active (49% and 79% inhibition at 24 and 96 h, respectively). The hydroquinones 1, 2 and 3 were effective at 96 h after challenge (62%, 73% and 60% inhibition, respectively), while some of the dicaffeoylquinic derivatives (4 and 7) produced slightly lower reduction of the inflammatory reaction.

Several Asteraceae species, many of them from the Inuleae tribe [1], are used in traditional medicine as anti-inflammatory and anti-allergic agents [2], [3], [4]. In the present study we have determined the effects of *Phagnalon rupestre* on hypersensitivity-associated inflammation by applying the contact hypersensitivity (CHS) inducer 2,4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB), and the classic delayed-type hypersensitivity (DTH) model by injection of sheep red blood cells (SRBC) to mice. CHS and DTH are cell-mediated immunity reactions which play a major role in the pathology of many inflammatory disorders [5].

The methanolic extract, administered after DNFB challenge, reduced the edema by 42% and 39%, at 24 h and 96 h respectively (Fig. 1). In the SRBC test, it significantly inhibited the reaction at 18 h by 32%. The hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc and BuOH subextracts were tested against DNFB (Fig. 1). The EtOAc subextract was the most active, inhibiting the swelling by 55% at 24 h after challenge and maintaining this effect after 96 h. The hexane and BuOH subextracts inhibited the reaction by 47% and 40% at 24 h, respectively.

The next step was to identify the compounds responsible for the activity of the EtOAc subextract. By gel filtration followed by vacuum liquid chromatography and low pressure liquid chromatography, three hydroquinone glycosides, four caffeoylquinic

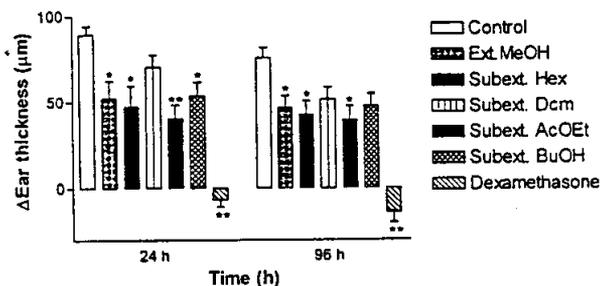


Fig. 1 Effect of the methanolic extract and the hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc and *n*-BuOH subextracts from *P. rupestre* on DNFB-induced CHS. Increase in ear thickness ( $\mu\text{m}$ ) was expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (Dunnett's *t*-test).

acid derivatives and one flavonoid were isolated. The hydroquinones were identified as 1-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl-2-(3',3'-dimethylallyl) hydroquinone (1), 1-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl-2-(3'-hydroxymethyl-3'-methylallyl) hydroquinone (2) and 1-*O*-(4''-*O*-caffeoyl)- $\beta$ -glucopyranosyl-2-(3',3'-dimethylallyl) hydroquinone (3) (Fig. 2). We have recently demonstrated all three substances to be new natural compounds [6]. Compounds 4 and 5 were readily identified by comparison of their <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic data with those of the literature values [7], [8] as 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (4), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (5), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (6) and as 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (7) (Fig. 2). The methyl esters 4 and 5 are not artifacts, since they were also chromatographically detected in an ethanolic extract of the plant. Finally, compound 8 was identified as luteolin 7-*O*- $\beta$ -glucoside through comparison of its NMR data with those already published [9].

Each of the eight isolated compounds was tested topically for its inhibitory activity on the DNFB-induced CHS. The flavonoid was the most active one, since it reduced the swelling by 49% and 79% at 24 and 96 h, respectively. The hydroquinone glycosides 2 and 3 caused similar inhibition of the elicitation phase: 47% and 45%, respectively, at 24 h, and their effects intensified at 96 h. Methyl esters of dicaffeoylquinic acid isomers (4 and 5) reduced the reaction by 43% and 25% at 24 h, respectively, while carboxyl-free quinic acid derivatives (6 and 7) were inactive. At 96 h, compounds 4 and 7 produced a significant reduction of the inflammatory reaction: 55% and 46% inhibition, respectively (Fig. 3).

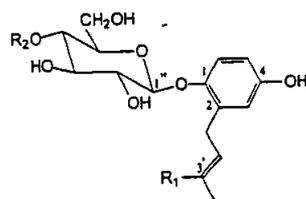
The reasonably high reduction of the swelling observed at 24 h for the flavonoid 8 and for the hydroquinones 2 and 3 imply that, after only one administration, these compounds should interfere with the initial events of the elicitation phase, which are lymphocyte-dependent mast cell degranulation, vasodilatation and neutrophil influx [10]. The activity of 8 at the earliest elicitation phase may be explained by some of mechanisms known for flavonoids, among them the powerful inhibition of protein kinase C (PKC), an enzyme responsible for the migration of Langerhans' cells from the epidermis, a key feature of CHS development [11]. The *in vitro* inhibition of PKC [12], [13] is characteristic of the flavonoids sharing a 2–3 double bond and a 3',4'-dihydroxy substitution, as occurs in compound 8. A similar pattern of structure/activity relationship was proposed for flavonoids as inhibitors of the expression of intercellular adhesion molecule-1

**Affiliation:** Departament de Farmacologia, Universitat de València, Burjassot, Spain

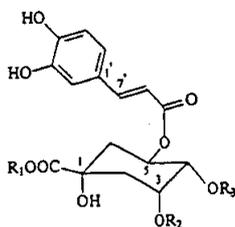
**Correspondence:** Prof. José L. Ríos Cañavate · Departament Farmacologia · Universitat de València · Avda. Vicent Andrés Estellés s/n · 46100 Burjassot · Spain · Phone/Fax: +34-963864973 · E-Mail: riosjl@uv.es

**Received:** June 25, 2001 · **Accepted:** January 20, 2002

**Bibliography:** *Planta Med* 2002; 68: 1–3 · © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0032-0943



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
(1)	CH <sub>3</sub>	H
(2)	CH <sub>2</sub> OH	H
(3)	CH <sub>3</sub>	caffeoyl



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
(4)	CH <sub>3</sub>	caffeoyl	H
(5)	CH <sub>3</sub>	H	caffeoyl
(6)	H	caffeoyl	H
(7)	H	H	caffeoyl

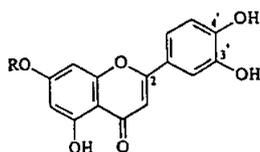
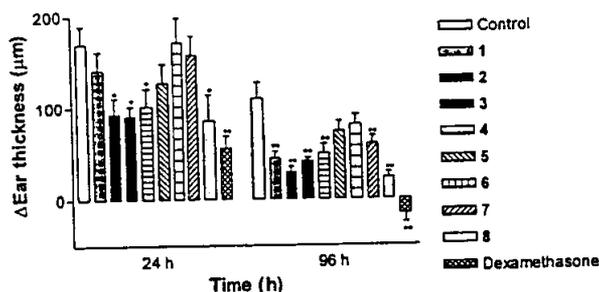
(8) R =  $\beta$ -Glucose

Fig. 3 Effect of the compounds 1–8 isolated from *P. rupestre* EtOAc subextract on DNFb-induced CHS. Increase in ear thickness ( $\mu\text{m}$ ) was expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (Dunnett's t-test).

(ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin on human endothelial cells. Although apigenin (5,7,4'-trihydroxyflavone) was the most potent flavonoid tested ( $\text{IC}_{50} = 12.5 \mu\text{M}$ ) for the inhibition of ICAM-1 expression and reduced the CHS-inflammation induced by oxazolone, luteolin also showed comparable activity for ICAM down-regulation ( $\text{IC}_{50} = 25 \mu\text{M}$ ) [14].

Fig. 2 Chemical structures of the compounds isolated from *P. rupestre* EtOAc subextract.

No reports are found about the inhibition on hypersensitivity by hydroquinones, a class of recognised potential inducers of CHS through their easy transformation into *p*-benzoquinones [15]. The presence of a glucose blocking the hydroxy group at C-1 prevents oxidation, thus avoiding a sensitising effect. Other studies revealed that prenylhydroquinones have anti-inflammatory activity in some models of edema by 12-*O*-tetradecanoylphorbol acetate (TPA) or carrageenan, because of the inhibition of eicosanoid release determined through human synovial phospholipase A<sub>2</sub> activity and leukotriene B<sub>4</sub> and thromboxane A<sub>2</sub> production [16], [17].

To our knowledge this is the first evidence of the activity of dicaffeoylquinic derivatives as inhibitors on CHS. In contrast, 3,4-dicaffeoylquinic acid and 5-monocaffeoylquinic enhanced the proliferation of human mononuclear cells determined by <sup>3</sup>H-thymidine uptake, and production of interferon- $\gamma$ , probably through an increase in cytokine production [18].

#### Materials and Methods

**General:** NMR spectra were run on a 400 MHz Bruker AMX instrument in CD<sub>3</sub>OD and DMSO. FABMS were carried out in a VG Auto Spec (Fisons). Analytical TLC was carried out on Merck silica gel F<sub>254</sub> and RP-18 aluminium sheets visualised with 1% sulfuric acid-anisaldehyde.

**Plant material:** The flowering aerial parts of *Phagnalon rupestre* (L.) DC. (Asteraceae) was collected in Serra de Corbera (Valenci, Spain). A voucher specimen (DF7) is kept in the Herbarium of the Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia.

**Extraction and isolation:** The air-dried and powdered aerial part (660.0 g) of *Phagnalon rupestre* (Asteraceae) was extracted by stirring with MeOH. The methanolic extract (100.0 g) was suspended in water and fractionated with solvents of increasing polarity to obtain the subextracts hexane (12.5 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.6 g), EtOAc (17.8 g) and BuOH (20.7 g). The EtOAc subextract was filtered over Sephadex LH-20 with MeOH so as to yield twelve fractions. The fourth fraction (3.8 g) was subjected to VLC on a silica gel 60 (Merck) column and eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH mixtures and MeOH. The fraction eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1) (fraction IV-6) was rechromatographed on a Lobar B column of RP-18 (Merck) with MeOH-H<sub>2</sub>O (6:4), and 1 (1.2 g) was obtained from the fifth fraction. Fraction IV-7 was purified by silica gel 60 with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1) to yield 2 (8 mg). Fractionation of the sixth fraction (0.9 g) over silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH mixtures followed by purification on a Lobar B column of silica gel (Merck) with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (95:5) gave 3 (50 mg) [6]. The ninth fraction (6.0 g) was further chromatographed on silica gel 60 (Merck) column and eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH mixtures to yield fourteen fractions. The fraction IX-9 eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (95:5) was rechromatographed on a Lobar B column of RP-18 (Merck) with MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1) to obtain compounds 4 (408 mg [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>: -175°; MeOH, c 0.1) and 5 (80 mg [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>: -213°; MeOH, c 0.1). The fraction IX-14 was purified on a Lobar B column of RP-18 with MeOH-H<sub>2</sub>O (6:4) and gave compounds 6 (372 mg [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>: -202°; MeOH, c 0.1), 7 (42.9 mg [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>: -172°; MeOH, c 0.1) and 8 (33.7 mg).

**2,4-Dinitro-1-fluorobenzene-induced contact hypersensitivity (DNFB-CHS)** [19]. The sensitisation phase was induced by topical application of 20 µL of 0.2% (v/v) DNFB in acetone onto the shaved abdomen on days 0 and 1 (total 80 µg). To elicit CHS reaction, the animals were challenged by application of 20 µL of 0.2% DNFB in acetone (40 µg/ear) on the inner and outer surfaces of both ears five days after the first sensitising dose. The ear swelling reaction was assessed 24 and 96 h after challenge by measuring ear thickness with a micrometer (Mitutoyo). The MeOH extract from *P. rupestre* (1 mg/ear), EtOAc and *n*-BuOH subextracts and compounds 1, 7, 8 (0.5 mg/ear) were dissolved in EtOH/H<sub>2</sub>O (8:2). *n*-Hexane and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> subextracts, compounds 2,3,5 and 6 (0.5 mg/ear) and dexamethasone (0.05 mg/ear) were dissolved in acetone. All were applied topically (20 µL) to both sides of both ears 2, 24, 48 and 72 h after challenge.

**Sheep red blood cell-induced delayed hypersensitivity (SRBC-DTH)** [19]. Mice were sensitised on day 0 by injecting subcutaneously into the back 2 × 10<sup>7</sup> SRBC in 0.1 mL of PBS. Five days later, SRBC-immunised mice were challenged by injecting 1 × 10<sup>8</sup> SRBC in 0.025 mL of PBS in the right hind paw while the left hind paw received solvent only. The thickness of the hind paw was measured with a micrometer 18 and 24 h after challenge. Dexamethasone (10 mg/kg) and the MeOH extract (50 mg/kg), dissolved in EtOH/Tween 80/H<sub>2</sub>O 1:1:10, were administered intraperitoneally (0.3 mL) immediately before and 16 h after challenge.

**Statistics:** Edemas are expressed as mean ± s. e. m. Inhibition percentages are obtained from the differences between treated and non-treated ears, and are referred to the control which was treated only with the DTH inducers. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's t-test for multiple comparisons of unpaired data was used for statistical evaluation.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Secretaría de Estado de Universidades e Investigación of the Spanish Government (grant PM98-0206). We thank Prof. J. B. Peris, Department of Plant Biology, for botanical identification.

#### References

- <sup>1</sup> Engler A. Syllabus der Pflanzenfamilien. Part II. Berlin: Gebrüder Bornträger, 1964: 488-90
- <sup>2</sup> Font Quer P. Plantas Medicinales. Vol. 3. Barcelona: Labor, 1993: 788-9
- <sup>3</sup> Máñez S, Recio MC, Gil I, Gómez C, Giner RM, Waterman PG, Ríos JL. A glycosyl analogue of diacylglycerol and other anti-inflammatory constituents from *Inula viscosa*. Journal of Natural Products 1999; 62: 601-4
- <sup>4</sup> Sala A, Recio MC, Máñez S, Giner RM, Ríos JL. New acetophenone glycosides isolated from extracts of *Helichrysum italicum* with anti-inflammatory activity. Journal of Natural Products 2001; 64: 1360-2
- <sup>5</sup> Robert C, Kupper TS. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. The New England Journal of Medicine 1999; 341: 1817-28
- <sup>6</sup> Góngora L, Giner RM, Máñez S, Recio MC, Ríos JL. New prenylhydroquinone glycosides from *Phagnalon rupestre*. Journal of Natural Products 2001; 64: 1111-3
- <sup>7</sup> Pauli GF, Poetsch F, Nahrstedt A. Structure assignment of natural quinonic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. Phytochemical Analysis 1998; 9: 177-85

- <sup>8</sup> Timmermann BN, Hoffmann JJ. Constituents of *Chrysothamnus paniculatus* 3,4,5-tricaffeoylquinic acid (a new shikimate prearomatic) and 3,4-, 3,5- and 4,5-dicaffeoylquinic acids. Journal of Natural Products 1983; 46: 365-8
- <sup>9</sup> Lu Y, Foo LY. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. Phytochemistry 2000; 55: 263-7
- <sup>10</sup> Grabbe S, Schwarz T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. Immunology Today 1998; 19: 37-44
- <sup>11</sup> Halliday GM, Lucas AD. Protein kinase C transduces the signal for Langerhans' cell migration from the epidermis. Immunology 1993; 79: 621-6
- <sup>12</sup> Ferriola PC, Cody V, Middleton E Jr. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. Biochemical Pharmacology 1989; 38: 1617-24
- <sup>13</sup> Agullo G, Gamet-Payrastra L, Manenti S, Viala C, Rémésy C, Chap H, Payrastra B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. Biochemical Pharmacology 1997; 53: 1649-57
- <sup>14</sup> Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen Ch-P, Phan SA, Ligon GF, Perry CA. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. American Journal of Pathology 1995; 147: 278-92
- <sup>15</sup> Lepoittevin JP, Benezra C. Allergic contact dermatitis caused by naturally occurring quinones. Pharmaceutisch Weekblad. Scientific Edition 1991; 21: 119-22
- <sup>16</sup> Ferrándiz ML, Sanz MJ, Bustos G, Payá M, Alcaraz MJ, De Rosa S. Avarol and avarone, two new anti-inflammatory agents of marine origin. European Journal of Pharmacology 1994; 253: 75-82
- <sup>17</sup> Gil B, Sanz MJ, Terencio MC, De Giulio A, De Rosa S, Alcaraz MJ, Payá M. Effects of marine 2-polyprenyl-1,4-hydroquinones on phospholipase A<sub>2</sub> activity and some inflammatory responses. European Journal of Pharmacology 1995; 285: 281-8
- <sup>18</sup> Lin LC, Kuo YC, Chou CJ. Immunomodulatory principles of *Dichrocephala bicolor*. Journal of Natural Products 1999; 62: 405-8
- <sup>19</sup> Góngora L, Máñez S, Giner RM, Recio MC, Ríos JL. On the activity of trifluoperazine and palmitoylcarnitine in mice delayed hypersensitivity models. Life Sciences 2000; 66: 183-8

ARTÍCULO 4

**“Phenolic glycosides from *Phagnalon rupestre*”**

***Phytochemistry* 59: 857-860 (2002)**



PERGAMON

Phytochemistry □ (□□□□) □-□

PHYTOCHEMISTRY

www.elsevier.com/locate/phytochem

## Phenolic glycosides from *Phagnalon rupestre*

Luis Góngora<sup>a</sup>, Salvador Máñez<sup>a</sup>, Rosa M. Giner<sup>a</sup>, M. Carmen Recio<sup>a</sup>,  
Alexander Gray<sup>b</sup>, José-Luis Ríos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departament de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Avinguda Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, València, Spain  
<sup>b</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, University of Strathclyde, SIBS, 27 Taylor Street, Glasgow G4 0NR, Scotland, UK

Received 13 September 2001; received in revised form 18 December 2001; accepted 18 December 2001

### Abstract

Analysis of the butanol-soluble fraction from the methanolic extract of the aerial parts of *Phagnalon rupestre* (Asteraceae) has led to the isolation of seven phenolic compounds. Three have been identified on the basis of their NMR spectra as new natural compounds: the lignan 7,7'-bis-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8,8'-dihydroxymethyl-tetrahydrofuran-4-O-β-glucopyranoside (1), the prenylhydroquinone glycoside 1-O-β-glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3'-hydroxy-3'-methylbutyl) benzene (2) and the acetophenone glycoside 12-O-β-glucopyranosyl-9β,12-dihydroxytremetone (3). The known flavonoids apigenin-7-O-β-glucoside, luteolin-7-O-β-glucoside, luteolin-7-O-β-glucuronide and the acetophenone picein were also isolated.

**Keywords:** *Phagnalon rupestre*; Asteraceae; Lignan glycoside; Prenylhydroquinone glycoside; Acetophenone glycoside

### 1. Introduction

*Phagnalon* is one of the euro-mediterranean genera of the worldwide distributed subtribe Gnaphaliinae (tribe Inuleae, Asteraceae). *Phagnalon rupestre* (L.) DC. was recently characterized by the presence of new prenylhydroquinone glycosides (Góngora et al., 2001). Continuing phytochemical investigation on this species led to the isolation and identification of seven phenolic derivatives, three of them being here reported as new natural compounds.

### 2. Results and discussion

The phenolic compounds were obtained directly by precipitation or by gel filtration from the butanolic fraction of the methanolic extract of the aerial parts of *P. rupestre* followed by purification on silica gel and reverse phase liquid chromatography.

The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of 1 (Table 1) along with 2-D experiments (COSY, HMBC, HMQC) revealed the presence of a β-glucopyranoside with an aglycone portion consisting of 22 carbons. The latter portion gave proton and carbon shifts compatible with a bis-(dimethoxy-

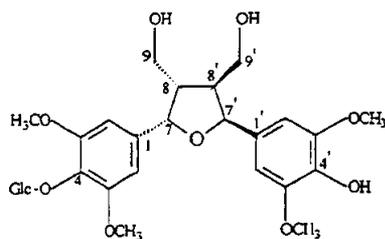
phenylpropanoid) skeleton and was closely similar to those of the lignan icariol-A<sub>2</sub> previously encountered in *Epimedium sagittatum* (Berberidaceae) (Matsushita et al., 1991), except that most of the signals for the lignan skeleton of the latter were duplicated. The most striking differences were observed in the chemical shifts of the carbons of the two aromatic rings of 1. For example, the significant differences between C-1 (139.9 ppm) and C-1' (133.4 ppm) and between C-3/C-5 (154.8 ppm) and C-3'/C-5' (149.7 ppm) indicated attachment of the glucose residue at C-4 (Della Greca et al., 1998). The protons at C-7 (C-7') and C-8 (C-8') appear to be *cis* orientated because the coupling constant between H-7 (H-7') and H-8 (H-8') is 4 Hz, which correspond to an angle of 25° according to the Insight II software applied. This configuration is opposite to that of the same protons in icariol A<sub>2</sub> for which *J* values (*trans*) are 8 Hz (Matsushita et al., 1991). This structure was confirmed by HREIMS, which gave a base peak at *m/z* 418 attributable to C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub> [M-glucose]<sup>+</sup>. So, this compound was identified as 7,7'-bis-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8,8'-dihydroxymethyl-tetrahydrofuran-4-O-β-glucopyranoside.

Compound 2, analyzed for C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>, by means of FABMS, showed a molecular ion at *m/z* 359 and 381 corresponding to [M+Na]<sup>+</sup>. The <sup>1</sup>H NMR spectrum displayed the signal pattern similar to that of a prenylhydroquinone previously identified in the EtOAc fraction

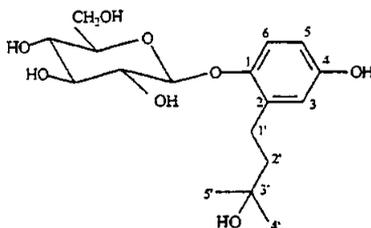
\* Corresponding author. Tel./Fax: +34-96-3864973.  
E-mail address: riosjl@uv.es (J.-L. Ríos).

2

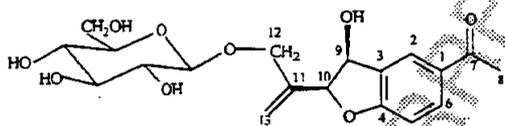
L. Góngora et al. | Phytochemistry □ (□□□□) □-□



1



2



3

of the methanol extract of this plant (Góngora et al., 2001). It showed three protons (H-3, H-5 and H-6) with an ABX system (6.56, *d*, *J* = 2.8 Hz; 6.52, *dd*, *J* = 8.8, 3.2 Hz; and 7.00, *d*, *J* = 8.8 Hz). Four aliphatic protons at  $\delta$  2.68 (2H, *m*) and 1.69 (2H, *m*), and two methyl groups at  $\delta$  1.24 and 1.25, derived from a prenyl chain. The presence of an hexose residue was deduced from the anomeric proton signal at  $\delta$  4.68 (*d*, *J* = 8 Hz) and two double doublets at  $\delta$  3.86 (1H<sub>b</sub>, *J* = 12.0, 2.0 Hz) and 3.67 (1H<sub>a</sub>, *J* = 12.0, 4.8 Hz). The <sup>13</sup>C NMR spectrum confirmed this structure, which showed six aromatic signals, two of them hydroxylated ( $\delta$  153.6 and 150.3), five aliphatic carbons, one of these quaternary and hydroxylated at  $\delta$  71.5, and six which corresponded to the sugar and matched with those of a  $\beta$ -glucopyranosyl moiety. Full assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR signals were accomplished using NOE experiments (Table 2). The structure of 2 was elucidated to be 1-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3'-hydroxy-3'-methylbutyl) benzene.

Compound 3, analyzed for C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub> by means of FABMS, showed a molecular ion at *m/z* 397 and 419

Table 1  
<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectral data of compound 1 (CD<sub>3</sub>OD; 400 and 100 MHz)

	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1	–	139.9
2	6.70 (1H, <i>s</i> )	105.2
3	–	154.8
4	–	135.9
5	–	154.8
6	6.70 (1H, <i>s</i> )	105.2
7	4.75 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 4.0 Hz)	87.6
8	3.12 (1H, <i>m</i> )	55.9 <sup>a</sup> /55.7 <sup>a</sup>
9	3.86–3.92 (1H <sub>a</sub> , <i>m</i> )	
	4.24–4.30 (1H <sub>b</sub> , <i>m</i> )	73.2 <sup>a</sup> /73.3 <sup>a</sup>
OCH <sub>3</sub>	3.83 (3H, <i>s</i> )	57.2 <sup>a</sup> /57.4 <sup>a</sup>
OCH <sub>3</sub>	3.83 (3H, <i>s</i> )	57.2 <sup>a</sup> /57.4 <sup>a</sup>
1'	–	133.4
2'	6.65 (1H, <i>s</i> )	104.8
3'	–	149.7
4'	–	136.6
5'	–	149.7
6'	6.65 (1H, <i>s</i> )	104.8
7'	4.70 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 4.0 Hz)	88.0
8'	3.12 (1H, <i>m</i> )	55.7 <sup>a</sup> /55.9 <sup>a</sup>
9'	3.86–3.92 (1H <sub>a</sub> , <i>m</i> )	
	4.24–4.30 (1H <sub>b</sub> , <i>m</i> )	73.2 <sup>a</sup> /73.3 <sup>a</sup>
OCH <sub>3</sub>	3.84 (3H, <i>s</i> )	57.2 <sup>a</sup> /57.4 <sup>a</sup>
OCH <sub>3</sub>	3.84 (3H, <i>s</i> )	57.2 <sup>a</sup> /57.4 <sup>a</sup>
1''	4.76 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.2 Hz)	105.7
2''	3.47 (1H, <i>m</i> )	76.1
3''	3.40 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.2 Hz)	78.2
4''	3.41 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.2 Hz)	71.7
5''	3.19 (1H, <i>m</i> )	78.7
6''	3.66 (1H <sub>a</sub> , <i>dd</i> , <i>J</i> = 12.0, 4.8 Hz)	
	3.77 (1H <sub>b</sub> , <i>dd</i> , <i>J</i> = 12.0, 2.4 Hz)	62.9

<sup>a</sup> Interchangeable.

Table 2  
<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectral data of compound 2 (CD<sub>3</sub>OD; 400 and 100 MHz)

	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1	–	153.6
2	–	135.2
3	6.56 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.8 Hz)	113.9
4	–	150.3
5	6.52 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8.8, 3.2 Hz)	117.2
6	7.00 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.8 Hz)	118.5
1'	1.69 (2H, <i>m</i> )	26.1
2'	2.68 (2H, <i>m</i> )	45.2
3'	–	71.5
4'	1.24 (3H, <i>s</i> )	28.9
5'	1.25 (3H, <i>s</i> )	29.4
1''	4.68 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.0 Hz)	104.2
2''	3.34–3.37 (2H, <i>m</i> )	75.1
3''	3.34–3.37 (2H, <i>m</i> )	78.1
4''	3.29 (1H, <i>m</i> )	71.6
5''	3.40 (1H, <i>m</i> )	78.0
6''	3.67 (1H <sub>a</sub> , <i>dd</i> , <i>J</i> = 12.0, 4.8 Hz)	
	3.86 (1H <sub>b</sub> , <i>dd</i> , <i>J</i> = 12.0, 2.0 Hz)	62.6

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

1 corresponding to  $[M + Na]^+$ . The  $^1H$  NMR spectrum  
 2 (Table 3) which displayed a signal pattern of a sub-  
 3 stituted acetophenone, presented three aromatic protons  
 4 (H-2, H-5 and H-6) with a typical ABX system ( $\delta$  7.99,  
 5  $d$ ,  $J=2.0$  Hz; 6.99,  $d$ ,  $J=8.5$  Hz; and 7.87,  $dd$ ,  $J=8.4$ ,  
 6 2.0 Hz). Two heterocyclic protons (H-9 and H-10), the  
 7 first one hydroxylated, were seen at  $\delta$  5.21 ( $d$ ,  $J=6.0$  Hz)  
 8 and 5.03 ( $d$ ,  $J=6.0$  Hz), respectively, and one methylene  
 9 group as an ABq system  $\delta$  4.23 and 4.40 ( $J=12.0$  Hz).  
 10 Finally, two geminal olefinic protons showed at  $\delta$  5.40  
 11 and  $\delta$  5.48, and one methyl group at  $\delta$  2.53. Moreover,  
 12 this spectrum showed a signal for an anomeric proton at  
 13  $\delta$  4.32 and two double doublets at  $\delta$  3.78 and 3.68, which  
 14 indicated the presence of a glucosyl residue. The  $^{13}C$   
 15 NMR spectra (Table 3) showed 19 carbons, 13 corre-  
 16 sponding to the aglycone and six to the sugar moiety. It  
 17 showed two olefinic carbons, C-11 and C-13, at  $\delta$  140.7  
 18 and 113.4, respectively, and carbonyl signal at  $\delta$  196.4.  
 19 An hydroxylated carbon (C-9) of the heterocycle  
 20 appeared at  $\delta$  70.2 while the signal at  $\delta$  88.4 corre-  
 21 sponded to C-10 of the same ring. The value of the  
 22 coupling constant between H-9 and H-10 ( $J=6.0$  Hz) is  
 23 indicative of eclipsed protons, and corresponds to the  
 24 cisoid configuration  $9\beta$ -hydroxy- $10\beta$ -isopropenyl, since  
 25 its is twice greater than that described by Hänsel et al.  
 26 (1980) for 13-acetoxy-toxol, a  $9\alpha$ -hydroxy- $10\alpha$ -isopro-  
 27 penyl derivative isolated from *Helichrysum italicum*  
 28 (Compositae). The structure of 3 was then elucidated to  
 29 be 12-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl- $9\beta$ ,12-dihydroxytremetone.  
 30

33 Table 3  
 34  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR spectral data of compound 3 ( $CD_3OD$ ; 400 and 100  
 35 MHz)

	$^1H$	$^{13}C$
37		
38	1	131.1
39	2	131.7
40	3	130.9
41	4	163.3
42	5	110.1
43	6	127.3
44	7	196.4
45	8	26.8
46	9	70.2
47	10	88.4
48	11	140.7
49	12	4.23 ( $1H_a$ , $d$ , $J=12.0$ Hz)
50	13	4.40 ( $1H_b$ , $d$ , $J=12.0$ Hz)
51	1'	5.40 ( $1H_a$ , $s$ )
52	2'	5.48 ( $1H_b$ , $s$ )
53	3'	113.4
54	4'	103.1
55	5'	73.8
56	6'	76.8
		70.5
		77.2
		3.78 ( $1H_a$ , $dd$ , $J=12.0, 2.8$ Hz)
		3.68 ( $1H_b$ , $dd$ , $J=12.0, 4.8$ Hz)

The remaining compounds were identified as apigenin-  
 7-*O*- $\beta$ -glucoside (4), luteolin-7-*O*- $\beta$ -glucoside (5), luteolin-  
 7-*O*- $\beta$ -glucuronide (6) and 4-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl-4-  
 hydroxyacetophenone (picein, 7) by comparison of their  
 UV and NMR data with those of the literature (Agrawal  
 and Bansal, 1989; Dommissie et al., 1986).

Although the Asteraceae are not a family character-  
 ized by a high occurrence of lignans, different members  
 of substituted tetrahydrofurans and, more frequently,  
 2,6-diaryl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octanes, such as the  
 pinosresinol derivatives from *Mikania saltensis* (Cuenca  
 and Catalán, 1991) and the sesamin-type lignans from  
*Artemisia arborescens* (Marco et al., 1997) and *Podolepis*  
*speciosa* (Jaensch et al., 1989) have been described. Among  
 the tetrahydrofurans, a 3,4-dibenzyltetrahydrofuran from  
*Artemisia chamaemelifolia* (Marco et al., 1996) and the 2-  
 aryl-4-benzyltetrahydrofurans 2-hydroxyolivil from *Car-  
 datus assoi* (Fernández et al., 1991) and acuminatin from  
*Helichrysum acuminatum* (Jakupovic et al., 1987) were  
 identified. However, this is the first time, to our knowl-  
 edge, that a 2,5-diphenyltetrahydrofuran derivative is  
 found in this family. Concerning the appearance of  
 furan-acetophenones, which are in fact one of the most  
 characteristic chemical features of the Asteraceae, they  
 can be found in many species of the family, not random,  
 but mainly located in the tribes Astereae, Eupatorieae,  
 Heliantheae, Inuleae and Senecioneae (Proksch and  
 Rodríguez, 1983). So, the present report of the occurrence  
 of compounds 3 and, to a lesser extent, 7 strengthens the  
 links between *Phagnalon* and *Helichrysum*, possibly one  
 of the best studied genus within the Inuleae. Other phen-  
 olic glycosides, such as the flavone apigenin and  
 luteolin derivatives are ubiquitous in Asteraceae.

### 3. Experimental

#### 3.1. General experimental procedures

NMR spectra were run on a 400 MHz ( $\delta$ , ppm) Bruker  
 AMX instrument in  $CD_3OD$ . FABMS and HREIMS  
 were carried out in a VG Auto Spec (Fisons). Optical  
 rotations were measured with a Perkin-Elmer 241 polari-  
 meter. UV spectra were obtained on a Shimadzu UV-2101  
 PC spectrophotometer. IR spectra were recorded as KBr  
 disks on a Mattson Satellite FTIR spectrophotometer.  
 Analytical TLC was carried out on Merck silica gel F<sub>254</sub>  
 and RP-18 aluminum sheets visualized with 1% sulfuric  
 acid-anisaldehyde.

#### 3.2. Plant material

The flowering aerial parts of *Phagnalon rupestre* were  
 collected in Sierra de Corbera (Valencia, Spain). A vou-  
 cher specimen (DF7) of the plant is kept in the Herbarium  
 of the Department of Pharmacology, University of  
 Valencia.

### 3.3. Extraction and isolation procedures

The BuOH subextract (19 g) of the methanolic extract of the dry aerial parts of *P. rupestre* (660 g), obtained after successive liquid partition with hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc and BuOH, was filtered over Sephadex LH-20 with MeOH to yield 16 fractions. The eighth fraction (fr. VIII, 3.15 g) was further fractionated over silica gel 60 (Merck) column and eluted with Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-MeOH (9:1) to obtain 12 subfractions. The fifth fraction (fr. VIII-5) gave compound 1 (6.1 mg). The seventh fraction (fr. VIII-7, 227 mg) was re-chromatographed on a Lobar B column of RP-18 (Merck) with MeOH-H<sub>2</sub>O (25:75) to obtain eight fractions and the last one yielded compound 2 (13.2 mg). The eighth fraction (fr. VIII-8, 141 mg) gave compound 4 (18 mg) which precipitated after adding methanol. The methanol-soluble portion of fraction VIII-8 was re-chromatographed on a Lobar B column of RP-18 (Merck) with MeOH-H<sub>2</sub>O (2:8) to give compound 3 (6.2 mg). Compounds 5 (902.8 mg) and 6 (98.6 mg) were directly obtained by precipitating from fractions ninth (fr. IX) and 11th (fr. XI), respectively. The ninth fraction (fr. VIII-9, 234 mg) was purified over Lobar B column of RP-18 (Merck) with MeOH-H<sub>2</sub>O (15:85) to yield compound 7 (5.1 mg).

#### 3.3.1. 7,7'-Bis-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8,8'-dihydroxymethyl-tetrahydrofuran-4-O-β-glucopyranoside (1)

Amorphous powder; [α]<sub>D</sub> -13° (MeOH; c 0.1); UV λ<sub>max</sub> (MeOH) 212, 273 nm; IR ν<sub>max</sub> (KBr) 3394, 2925, 2854, 1596, 1519, 1468, 1224, 1122 cm<sup>-1</sup>; HREIMS m/z 418.16 (100), 388.15 (17), 181.04 (55).

#### 3.3.2. 1-O-β-D-Glucopyranosyl-4-hydroxy-2-(3'-hydroxy-3'-methylbutyl) benzene (2)

Amorphous powder; [α]<sub>D</sub> -39° (MeOH; c 0.1); UV λ<sub>max</sub> (MeOH) 217, 283 nm (+ NaOH) 238, 298 nm; IR ν<sub>max</sub> (KBr) 3409, 2967, 2927, 1627, 1500, 1451, 1384, 1297, 1215, 1075 cm<sup>-1</sup> FABMS m/z [M+Na]<sup>+</sup> 381, [M]<sup>+</sup> 359.

#### 3.3.3. 12-O-β-D-Glucopyranosyl-9 β 2-dihydroxytremetone (3)

Amorphous powder; [α]<sub>D</sub> -5° (MeOH; c 0.1); UV λ<sub>max</sub> (MeOH) 222, 274 nm (+ NaOH) 211, 275 nm; IR

ν<sub>max</sub> (KBr) 3417, 2926, 1667, 1608, 1493, 1444, 1360, 1265 cm<sup>-1</sup>; FABMS m/z [M+Na]<sup>+</sup> 419, [M]<sup>+</sup> 397.

### Acknowledgements

The authors thank Dr. J.B. Peris, Department of Plant Biology, University of Valencia, for his help in botanical aspects. This work was supported by the Secretaria de Estado de Universidades e Investigación of the Spanish Government (grant PM98-0206).

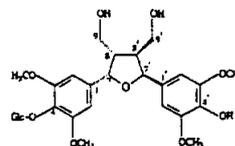
### References

- Agrawal, P.K., Bansal, M.C., 1989. Flavonoid glycosides. In: Agrawal, P.K. (Ed.), Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier, Amsterdam, pp. 283–364.
- Cuenca, M.R., Catalán, C.A.N., 1991. Monoterpenes and lignans from *Mikania saltensis*. J. Nat. Prod. 54, 1162–1164.
- Della Greca, M., Ferrara, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Previtiera, L., 1998. Antialgal compounds from *Zantedeschia aethiopica*. Phytochemistry 49, 1299–1304.
- Domisse, R.A., Van Hoof, L., Vietinck, A.J., 1986. Structural analysis of phenolic glucosides from Salicaceae by NMR spectroscopy. Phytochemistry 25, 1201–1204.
- Fernández, I., García, B., Pedro, J.R., Varela, A., 1991. Lignans and flavonoids from *Carduus assoi*. Phytochemistry 30, 1030–1032.
- Góngora, L., Giner, R.M., Mániz, S., Recio, M.C., Rios, J.L., 2001. New prenylhydroquinone glycosides from *Phagnalon rupestre*. J. Nat. Prod. 64, 1111–1113.
- Hänsel, R., Cybulski, E.M., Çubukçu, B., Meriçli, A., Böhlmann, F., Zdero, C., 1980. Neue Pyron-derivative aus *Helichrysum*-Arten. Phytochemistry 19, 639–644.
- Jaensch, M., Jakupovic, J., King, R.M., Robinson, H., 1989. Pyrones and other constituents from *Podolepis* species. Phytochemistry 28, 3497–3501.
- Jakupovic, J., Pathak, V.P., Böhlmann, F., King, R.M., Robinson, H., 1987. Obliquin derivatives and other constituents from Australian *Helichrysum* species. Phytochemistry 26, 803–807.
- Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.F., Morante, M.D., García-Lliso, V., Vallés-Xirau, J., Jakupovic, J., 1996. Tricyclic sesquiterpenes from *Artemisia chamaemelifolia*. Phytochemistry 41, 837–844.
- Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.F., García-Lliso, V., Vallés-Xirau, J., 1997. Sesquiterpene lactones and lignans from *Artemisia arborescens*. Phytochemistry 44, 1133–1137.
- Matsushita, H., Miyase, T., Ueno, A., 1991. Lignan and terpene glycosides from *Epimedium sagittatum*. Phytochemistry 30, 2025–2027.
- Proksch, P., Rodríguez, E., 1983. Chromones and benzofurans of the Asteraceae, their chemistry and biological significance. Phytochemistry 22, 2235–2248.

## GRAPHICAL ABSTRACTS

Phenolic glycosides from *Phagnalon rupestre*

Phytochemistry, □□□□, □, □□□

Luis Góngora<sup>a</sup>, Salvador Máñez<sup>a</sup>, Rosa M. Giner<sup>a</sup>, M. Carmen Recio<sup>a</sup>, Alexander Gray<sup>b</sup>, José-Luis Ríos<sup>a</sup><sup>a</sup>Departament de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Avinguda Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, València, Spain<sup>b</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, University of Strathclyde, SIBS, 27 Taylor Street, Glasgow G4 0NR, Scotland, UKA tetrahydrofuran lignan (1), a prenylhydroquinone and an acetophenone have been identified as glycosides in *Phagnalon rupestre*.



authorGATEWAY for Elsevier Science Journals



[home](#)

Track Paper

author log-in

user name :

password :

Auto login in future  [\[Help\]](#)

[Forgotten Password ?](#)

first time users

[Why create a Profile ?](#)

Find a journal

by title

by keyword(s)

by editor

Browse for journal

[by subject](#)

[by alphabetical list](#)

Tell us what you think...

[Complete our online survey and help improve the site.](#)

Your paper's details and status are shown in the following table:

Paper status

Article Title	Phenolic glycosides from Phagnalon rupestre
Our Reference	PHYTO6777
Journal Title	Phytochemistry
Volume / Issue	59/8 pp. 857-860
Corresponding Author	Prof. Dr. J.-L. Rios
First Author	Dr. L. Gongora
Received at ES	02 JAN 2002
Proofs Sent To Author	18 JAN 2002
Proofs Returned	21 JAN 2002
Scheduled Publication	JUN 2002
status comment	Volume, issue and page numbering are now available for citing your paper. The scheduled publication date for the journal may change and any changes to this date will be shown when available.

Publish

[About Auth](#)  
[About Elsev](#)  
[Why publis](#)  
[Book Publi](#)

Submit

[Quick guid](#)  
[Artwork ins](#)

After Acc

[What happ](#)  
[Proofreadir](#)  
[Copyright i](#)  
[Tracking vs](#)

Index

[Author Ga](#)  
**ELSEVI**

**SCIENC**  
[The premie](#)  
[inf](#)

**SC**

[The sea](#)

**Event**

[The sour](#)  
[event](#)

scisearch

[The best](#)  
[leader](#)

ARTÍCULO 5

**“Phenolic methylquinates from *Phagnalon rupestre* are competitive inhibitors of xanthine oxidase and impair lipid peroxidation”**

*Free Radical Research* (enviado)

Phenolic methylquinates from *Phagnalon* are competitive inhibitors of  
xanthine oxidase and impair lipid peroxidation

Luis Góngora<sup>1</sup>, Salvador Máñez<sup>1</sup>, Rosa María Giner<sup>1</sup>, María del Carmen Recio<sup>1</sup>,  
Guillermo Schinella<sup>2</sup>, José Luis Ríos<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departament de Farmacologia. Universitat de València. Avda. Vicent Andrés Estellés  
s/n, 46100 Burjassot, Valencia (Spain)

<sup>2</sup>Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La  
Plata, Calle 60 y 120, 1900 La Plata (Argentina)

Running title: Xanthine oxidase inhibition by caffeoyl esters

\*Corresponding senior author Tel./Fax: +34-963864973. *E-mail*: riosjl@uv.es

*Abbreviations*: ROS, reactive oxygen species; BHT, 2,6-di (*tert*-butyl)-4-methylphenol;  
DMSO, dimethylsulphoxide; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical; NBT,  
nitroblue tetrazolium; DCPIP, 2,6-dichlorophenolindophenol; TBARS, thiobarbituric  
acid-reagent substances; LB, Lineweaver-Burk

## ABSTRACT

In order to determine the antioxidant activity of the anti-inflammatory phenolic principles isolated from *Phagnalon rupestre* (Asteraceae), we have studied their effect on lipid peroxidation and superoxide free radical systems. The caffeoyl conjugates of prenylhydroquinone glucoside and of quinic acid, either in the carboxyl-free or carboxymethyl forms, showed inhibitory activity on lipid peroxidation induced by  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbate and by  $\text{CCl}_4/\text{NADPH}$  in rat liver microsomes, with  $\text{IC}_{50}$  values ranging from 3 to 11  $\mu\text{M}$ . After having demonstrated their effect on the xanthine oxidase-regulated superoxide production, the active compounds were tested for the direct inhibition of this enzyme. Methylated dicaffeoylquinic conjugates competitively inhibited the enzyme and the highest potency was obtained for the 4,5-diester, with an  $\text{IC}_{50}$  value of 3.6  $\mu\text{M}$ , near ten times lower than that of the 3,5-analogue. In conclusion, the presence of the caffeoyl moiety is essential for both the antiperoxidative and radical scavenging activities, and the methylation of the quinic carboxyl group enhances the potency on xanthine oxidase inhibitory activity.

Keywords: Caffeoylquinic; Hydroquinone; Antioxidant; Xanthine oxidase; Lipid peroxidation

## INTRODUCTION

Oxygen is essential for life but, under determined conditions, it can also constitute an aggressive element for living organisms. Reactive oxygen intermediates are produced in all aerobic organisms during respiration and exist in the cell in a balance with enzymatic and non-enzymatic antioxidant defence systems. Reactive oxygen species (ROS) form a group that includes both radicals ( $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{NO}\cdot$  and  $\text{O}_2\cdot^-$ ) and non-radicals ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{ONOO}^-$ ). When an imbalance occurs between production of ROS and antioxidant systems, many cellular components, such as membranes, proteins and DNA are easily damaged. This phenomenon is known as oxidative stress and is implicated in numerous human conditions such as inflammation, cancer, atherosclerosis, anaemia, age-related degeneration, parkinsonism and in other circumstances such as organ transplantation in which ischemia-reperfusion is common<sup>1-2</sup>.

Lipid peroxidation is a process characterised by chain-reactions mediated by free radicals, which result in the diminution of membrane fluidity, destabilisation of membrane receptors and alteration of cell permeability. Lipid peroxidation products, particularly the aldehyde derivatives, can inhibit protein synthesis, block macrophage action and alter chemotaxis and enzymatic activity<sup>2-5</sup>.

Superoxide anions are generated by mitochondrial autooxidation or through the activation of cytoplasmatic enzymes such as xanthine oxidase, cytochrome  $\text{P}_{450}$  and other oxidases. Particularly important is xanthine oxidase as this is associated with the metabolism of xanthine and hypoxanthine and, therefore, with the incidence of hyperuricaemia-related disorders such as gout and renal stones. The accumulation of uric acid also causes inflammation through production of leukotriene  $\text{B}_4$  and stimulation of a respiratory burst in neutrophils, in which ROS such as  $\text{O}_2\cdot^-$  and the subsequent formation of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HOCl}$  and  $\text{OH}\cdot$ , contributes to the exacerbation of the defence

response. Because of this, inhibition of superoxide anion production could be an effective strategy in the treatment of inflammation<sup>1,5</sup>.

The influence of ROS in inflammatory responses is also found to some skin disorders such as allergic contact dermatitis induced by metallic ions<sup>6</sup> or chemical allergens such as *p*-phenylenediamine<sup>7</sup>. It has recently been reported that different products of plant origin can inhibit such processes, as in the case of the aromatic compounds studied in this paper, which our group isolated from *Phagnalon rupestre*<sup>8</sup> and those isolated from *Polygonum tinctorium* by Kunikata *et al.*<sup>9</sup>.

In order to uncover the possible participation of antioxidative defence mechanisms in the activity of phenolic compounds from *P. rupestre*, we have investigated its radical scavenging activity, its inhibitory activity on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation systems and its inhibitory effects on superoxide anion generation and xanthine oxidase activity. These compounds are the following: three hydroquinone glucosides<sup>10</sup>, 1-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3',3'-dimethylallyl) benzene (1), 1-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3'-hydroxymethyl-3'-methylallyl) benzene (2), 1-*O*-(4''-*O*-caffeoyl)- $\beta$ -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3',3'-dimethylallyl) benzene (3); and four dicaffeoylquinic derivatives, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (4), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (5), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (6), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (7).

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Test compounds were isolated from *Phagnalon rupestre* (Asteraceae) as previously described<sup>8,10</sup>. Reference compounds allopurinol, BHT (2,6-di (*tert*-butyl)-4-

methylphenol) and pyrogallol, and chemicals for pharmacological assays were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

#### Liver Microsomal Preparations

Liver microsomes were prepared by standard differential centrifugation techniques as described by Slater and Sawyer<sup>11</sup>. Briefly, under ketamine anaesthesia male Wistar rats (200-250 g body weight) were killed by exsanguination from the abdominal aorta. The liver was exhaustively perfused with ice-cold saline through the portal vein until uniformly pale, immediately removed, and weighed. After being trimmed and minced, the pieces of liver were homogenised with 4 volumes of ice-cold 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 1.15 % (w/v) KCl. The homogenate was spun at 10,000 x g for 30 min. The supernatant was collected and further centrifuged at 105,000 x g for 60 min. The resultant microsomal fraction was washed and resuspended in the same buffer as above. Aliquots of microsomal suspensions in 30 mM phosphate buffer pH 7.4 containing 8.8 g/L KCl were stored at -80° C for 2 months. Protein contents were quantified by Lowry's method using bovine serum albumin as standard<sup>12</sup>.

#### Lipid Peroxidation Induced by the Fe<sup>2+</sup>/ascorbate System

Lipid peroxidation was measured as previously described Halliwell et al.<sup>13</sup>. The reaction mixtures contained 2 mg of microsomal protein/ml in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4. Peroxidation was induced by FeSO<sub>4</sub> (5 μM) and ascorbate (500 μM). The samples were incubated in triplicate at 37°C for 20 min in the presence of different concentrations of products dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO). Products of lipid peroxidation were determined by the thiobarbituric acid method, measuring the absorbance at 532 nm<sup>14</sup>.

Appropriate controls were performed to discard any possible interference with the thiobarbituric acid assay. BHT was used as reference compound.

#### Lipid Peroxidation Induced by the CCl<sub>4</sub>/NADPH System

Reaction mixtures contained 1.5 mg/ml of microsomal proteins and a NADPH-generating system (0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 4 mM glucose-6-phosphate, 0.6 units glucose-6-phosphate dehydrogenase) in the same buffer as above. Peroxidation was started by addition of CCl<sub>4</sub> (0.02 M). After 15 min of incubation at 37°C, thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) were determined as above. BHT was used as reference compound <sup>11</sup>.

#### Reduction of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical

Reduction of radical was determined according to Cavin <sup>15</sup> with some modifications: 1.5 ml of a 20 mg/l solution of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) in methanol were added to 0.75 ml of a solution of test compound in methanol. Absorbance at 517 nm was determined spectrophotometrically after 10 min and the scavenging activity was calculated as percentage of the radical reduction. Quercetin-3-*O*-glucoside was used as reference compound.

#### Xanthine Oxidase-induced Generation of Superoxide Radical

Superoxide was generated by enzymatic oxidation of hypoxanthine (100 μM) with bovine milk xanthine oxidase grade I (0.006 U; one unit converts 1 μmol of xanthine to uric acid per min at pH 7.5 at 25° C) in 1 ml of 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH buffer, pH 7.4, and was detected by the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) at 100 μM, followed spectrophotometrically at 560 nm <sup>16</sup>. Pyrogallol was used as a reference compound. We

analysed the influence of compounds 4 and 5 on enzyme activity by measuring the uric acid formation from xanthine (2-25  $\mu\text{M}$ ) after 15 min incubation at 25° C, under air-saturated conditions, while absorbance was measured at 295 nm<sup>17</sup>. The increase in absorbance was recorded at 10 s intervals. The initial rate was calculated from the linear portion of each reaction, from 0.5 to 2.5 min. The procedure was repeated with different concentrations of the test compounds dissolved in DMSO, at a concentration that was always less than 1%. IC<sub>50</sub> values were calculated by lineal regression analysis and kinetic analysis of inhibition was determined only for those compounds with an IC<sub>50</sub> lower than 50  $\mu\text{M}$ . Allopurinol was used as the reference compound. To determine the possible interaction with the molybdenum-centre of the enzyme, the transfer of electrons from xanthine to 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP, 50  $\mu\text{M}$ ) was evaluated by monitoring the absorbance due to DCPIP at 600 nm. The reversibility of xanthine oxidase inhibition was tested by mixing the enzyme (0.6 U/ml) with the test compound (100  $\mu\text{M}$ ) for 30 min at 25°C. The inhibitor was then washed from the enzyme using an ultrafiltration unit from Millipore (Bedford, MA, USA) with a molecular mass cut-off of 10 kDa. After bringing the concentrated enzyme to the original volume and filtering twice, its activity was measured and compared with that of the control.

#### Data Analysis

Data were expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's *t*-test for multiple comparisons. Differences were considered significant at  $P < 0.01$ . The inhibitory concentration 50% (IC<sub>50</sub>) was calculated from the concentration/effect regression lines.

## RESULTS

The effect of phenolic compounds (1-7) from *P. rupestre* on lipid peroxidation was evaluated in rat liver microsomes stimulated with  $\text{Fe}^{2+}$ /ascorbate or with the  $\text{CCl}_4$ /NADPH enzymatically-regulated system.

In the first model, the absorbance due to TBARS decreased significantly in the presence of compounds 3-7; at a final concentration of 10  $\mu\text{M}$  we detected a 47 % inhibition for compound 3, while this value almost doubled in the case of the other compounds (Figure 1). The percentages of inhibition of the active compounds at the same concentration in the enzymatic lipid peroxidation were lower than those observed in the non-enzymatic system, as inhibition values approached 60 % (Figure 1). All of them exerted dose-dependent inhibitory effects in both systems and their  $\text{IC}_{50}$  values are reported in Table 1. The potency of the active compounds was in the range of 3-11  $\mu\text{M}$  and paralleled the values of efficacy.

Radical scavenging/reducing properties of compounds 1-7 were evaluated using the DPPH radical model (Figure 2). At 10  $\mu\text{M}$ , dicaffeoylquinic derivatives 4-7 had a high activity (85-100 % of absorbance inhibition) and caffeoyl-hydroquinone 3 exerted a similar effect. The potencies of compounds 3-7 were slightly higher in this test than those calculated for their anti-peroxidative activity, as  $\text{IC}_{50}$  values remained at less than 5  $\mu\text{M}$ .

The scavenging effect of test compounds on  $\text{O}_2^{\cdot -}$  was determined in the hypoxanthine/xanthine oxidase system (Figure 3). Compounds 4-7 again showed the highest degree of efficacy (90-100 % inhibition), while monocaffeoyl hydroquinone exerted two thirds of this effect, with  $\text{IC}_{50} = 5.8 \mu\text{M}$ , a value that nearly tripled those of dicaffeoylquinic derivatives (Table 1). In order to determine whether the activity of the

compounds was, in fact, due to a scavenging effect of superoxide radicals or rather to a direct inhibition of the xanthine oxidase, we tested the latter possibility. Results indicated that compound **5** was in fact a potent inhibitor of xanthine oxidase, being its  $IC_{50}$  (3.6  $\mu$ M) in the close range of allopurinol ( $IC_{50} = 2.6 \mu$ M). However, the notable effect of compound **4** in inhibiting the superoxide-induced reduction of NBT ( $IC_{50} = 2.3 \mu$ M) should partially depend on a moderate inhibition of the enzyme ( $IC_{50} = 30 \mu$ M), but certainly also on superoxide scavenging activity. As in the other tests, hydroquinones **1** and **2** were totally inactive.

The steady state measurements of the reaction of xanthine with xanthine oxidase in the presence of compounds **4** and **5** gave Lineweaver-Burk (LB) plots which were characteristic of competitive inhibition (Figure 4). The inhibition constant ( $K_i$ ) was determined from the slopes of the LB plots against inhibitor concentration and found to be 3.1  $\mu$ M for **4** and 0.24  $\mu$ M for **5**. Compounds **4** and **5** were also tested for reversibility of inhibition. The relative activity of the inhibitor-treated enzyme sample compared with that of the control sample after washing was 101 % for **4** and 99 % for **5**, indicating that the inhibition was a reversible process. When xanthine oxidase was treated with inhibitors there was no modification of the electron transfer activity from xanthine to DCPIP, thus suggesting that the inhibitors do not react with the molybdenum centre, since DCPIP directly accepted electrons from reduced molybdenum.

## DISCUSSION

Polyunsaturated fatty acids present in membrane lipids are fairly susceptible to oxidation, not only because of their natural instability, but also because of their association with enzymatic and non-enzymatic systems that generate free radical

species. These radicals trigger lipid peroxidation, one of the reactions induced by oxidative stress, which is of capital importance in many pathological conditions<sup>2</sup>.

This paper reports for the first time the results of a holistic study on the effects of the 3,5- and 4,5-dicaffeoylquinic conjugates, and their corresponding methyl esters, on lipid peroxidation and free radical scavenging. From the data obtained on the lipid peroxidation models, it is deducible that the activity is dependent on the caffeoyl moiety since the less complex hydroquinone glucosides **1** and **2** did not show any effect. Furthermore, double caffeoyl substitution roughly doubled the potency in the  $Fe^{2+}$ /ascorbate system, although this effect was not perceived in the enzymatic system. Of the caffeoylquinic derivatives **4-7**, neither carboxyl methylation nor positional isomerism exerted influence on the activity. The comparatively higher inhibitory effect of **3** on enzyme-dependent lipid peroxidation system could be attributed to an inhibitory effect of some cytochrome P450 isoenzymes.

Previously, it was reported that 3,5- and 4,5-dicaffeoylquinic acids inhibit lipid peroxidation induced by ADP/NADPH in rat liver microsomes, and by ADP/ascorbic acid in rat liver mitochondria<sup>18</sup>. It should be noted that, in that study, the effects witnessed in rat liver microsomes were greater than those obtained by ourselves in the same biological substrate after induction with  $CCl_4$ /NADPH. Later, it was demonstrated that 3,4-dicaffeoyl isomer inhibited the chemiluminescence associated with lipid peroxidation initiated in liver homogenates by *tert*-butyl hydroperoxide, with an  $IC_{50}$  value of 20  $\mu$ M, which indicated that this compound was markedly more potent than other natural phenolics, such as caffeic and chlorogenic acids, and flavonoid glycosides<sup>19</sup>. Recently, it has been reported that 3,5-dicaffeoylquinic acid inhibits the *in vitro* peroxidation of linoleic acid induced by 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride

<sup>20</sup>. Although in this case no potency parameters were given, it was shown that its efficacy was higher than that of the mono 5-caffeoylquinic derivative.

The role of oxygen-derived free radicals in the inflammatory process has been repeatedly established. Recently it has been recognised that reactive oxygen species act as second messengers in the propagation of proinflammatory or growth-stimulatory signals <sup>3, 21-23</sup>.

One of the biological sources of superoxide radical is xanthine oxidase, a complex metallo-flavo protein that is the key enzyme for purine catabolism because catalyses the oxidation of hypoxanthine to xanthine and uric acid. This enzyme is a target of drugs used against hyperuricemia and diseases characterised by oxygen-radical-induced tissue damage such as postischemic reperfusion injury although, the role of xanthine oxidase in the pathogenesis of such injury is still controversial <sup>24,25</sup>.

Concerning the direct influence of the assayed compounds on xanthine oxidase, monocaffeoyl hydroquinone **3** and the dicaffeoylquinic acids **6** and **7** did not interact with the enzyme, which highlighted their scavenging activity. So, it seems that methylation of the free carboxyl group of dicaffeoylquinic acids promotes the inhibitory activity of xanthine oxidase, and that the esterification at C-4 rather than at C-3 increases the potency in one order of magnitude. Only one prior study has been published in which it was demonstrated that 3,5-dicaffeoylquinic acid inhibits this enzyme, with an IC<sub>50</sub> value of 34 μM <sup>26</sup>. Our results for the same compound (**6**) have not ratified this data, possibly due to the different conditions of time and temperature. For comparative purposes, it should be noted that the IC<sub>50</sub> value for caffeic acid was reported to be higher than 50 μM <sup>27</sup>, suggesting a direct relationship between the number of phenolic groups within a molecule and its activity. However, in compound **5**, the 4,5-disubstitution with caffeoyl residues, combined with the methylation of the

carboxyl group at C-1, caused an increase in potency that surpassed the additive effect that would be expected from the mere presence of a second caffeoyl moiety. At last, in relationship to the essential features of established xanthine oxidase inhibitors, it should be noted that compound 5 presents notable analogies in potency and enzyme inhibition kinetics with the clinically-used reference drug allopurinol.

On the basis of the results obtained, it can be suggested that the phenolic methylquinates isolated from *Phagnalon rupestre* would be effective as natural antioxidants, through their double ability of inhibit lipid peroxidation and xanthine oxidase activity, and potentially useful for the treatment of some free radical-induced disorders.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Secretaría de Estado de Universidades e Investigación of the Spanish Government (grant PM98-0206). A part of the experiments was supported by CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo), from which LG was the recipient of a grant. GS is a member of CIC Provincia de Buenos Aires, Argentina.

#### References

- [1] B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford.
- [2] O. I. Aruoma (1998) Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of The American Oil Chemists' Society*, 75, 199-212.
- [3] V.R. Winrow, P.G. Winyard, C.J. Morris and D.R. Blake (1993) Free radicals in inflammation: second messenger and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin*, 3, 506-522.

- [4] H. De Groot and T. Noll (1987) The role of physiological oxygen partial pressures in lipid peroxidation. Theoretical considerations and experimental evidence. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44, 209-226.
- [5] J.P. Kerher and C.V. Smith (1994) Free radicals in biology: sources, reactivities, and roles in the ethiology of human diseases. In *Free radicals in biology: sources, reactivities, and roles in the ethiology of human diseases* (ed. B. Rei), Academic Press, London: pp 2-62.
- [6] L.T. Van den Broeke, A. Graslund, P. H. Larsson, J. L. Nilsson, J. E. Wahlberg, A. Scheynius and A. T. Karlberg (1998) Free radical as potential mediators of metal allergy: Effect of ascorbic acid on lymphocyte proliferation and IFN-gamma production in contact allergy to Ni<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup>. *Acta Dermato-Venereologica*, 78, 95-98.
- [7] M. Picardo, C. Zompetta, C. Marchese, C. De Luca, A. Faggioni, R. J. Schmidt and B. Santucci (1992) Paraphenylenediamine, a contact allergen, induces oxidative stress and ICAM-1 expression in human keratinocytes. *British Journal of Dermatology*, 126, 450-455.
- [8] L. Góngora, R. M. Giner, S. Máñez, M. C. Recio and J. L. Ríos (2002) *Phagnalon rupestre* as a source of compounds active on contact hypersensitivity. *Planta Medica* (in press)
- [9] T. Kunikata, T. Tatefuji, H. Aga, K. Iwaki, M. Ikeda and M. Kurimoto (2000) Indirubin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity. *European Journal of Pharmacology*, 410, 93-100.
- [10] L. Góngora, R. M. Giner, S. Máñez, M. C. Recio and J.L. Ríos (2001) New prenylhydroquinone glycosides from *Phagnalon rupestre*. *Journal of Natural Products*, 64, 1111-1113.

- [11] T. F. Slater and B. C. Sawyer (1971) The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reaction in rat liver fractions *in vitro*. *Biochemical Journal*, 123, 805-814.
- [12] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randal (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- [13] B. Halliwell (1990) How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications*, 9, 1-32.
- [14] A. Pompella, E. Maellaro, A. Casini, M. Ferrali, L. Ciccoli and M. Comporti (1987) Measurement of lipid peroxidation *in vivo*: a comparison of different procedures. *Lipids*, 22, 206-211.
- [15] A. Cavin, K. Hostettmann, W. Dyatmyko and O. Potterat (1998) Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Medica*, 64, 393-396.
- [16] M. J. Sanz, M.L. Ferrández, M. Cejudo, M. C. Terencio, B. Gil, G. Bustos, A. Úbeda, R. Gunasegaran and M. J. Alcaraz (1994) Influence of series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica*, 24, 689-699.
- [17] Y. Osada, M. Tsuchimoto, H. Fukushima, K. Takahashi, S. Kondo, M. Hasegawa and K. Komoriya (1993) Hypouricemic effect of the novel xanthine oxidase inhibitor, TEI-6720, in rodents. *European Journal of Pharmacology*, 241, 183-188.
- [18] Y. Kimura, H. Okuda, T. Okuda, T. Hatano, I. Agata and S. Arichi (1984) Studies on the Activities of Tannins and Related Compounds; V. Inhibitory Effects on Lipid Peroxidation in Mitochondria and Microsomes of Liver. *Planta Medica*, 50, 473-477.

- [19] C. G. Fraga, V. S. Martino, G. E. Ferraro, J. D. Coussio and A. Boveris (1987) Flavonoids as antioxidants evaluated by *in vitro* and *in situ* liver chemiluminescence. *Biochemical Pharmacology*, 36, 717-720.
- [20] K. Azuma, M. Nakayama, M. Koshioka, K. Ippoushi, Y. Yamaguchi, K. Kohata, Y. Yamauchi, H. Ito and H. Higashio (1999) Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3963-3966.
- [21] K. Hensley, K. A. Robinson, S. P. Gabbita, S. Salsman and R. A. Floyd (2000) Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 28, 1456-1462.
- [22] A. Saccani, S. Saccani, S. Orlando, M. Sironi, S. Bernasconi, P. Ghezzi, A. Mantovani and A. Sica (2000) Redox regulation of chemokine receptor expression *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 2761-2766.
- [23] B. Fischer and J. Voynow (2000) Neutrophil elastase induces MUC5AC messenger RNA expression by an oxidant-dependent mechanism. *Chest*, 117 Suppl., 317S-320S.
- [24] K. Ichimori, M. Fukahori, H. Nakasawa, K. Okamoto and T. Nishino (1999) Inhibition of Xanthine Oxidase and Xanthine deshydrogenase by Nitric Oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 7763-7768.
- [25] C. Enroth, B. T. Eger, K. Okamoto, T. Nishino and E. F. Pai (2000) Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 10723-10728.
- [26] T. Hatano, T. Yasuhara, R. Yoshihara, I. Agata, T. Noro and T. Okuda (1990) Effects of interaction of tannins with co-existing substances. VII. Inhibitory effects of

tannins and related polyphenols on xanthine oxidase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 38, 1224-1229.

[27] W. S. Chan, P. C. Wen and H. C. Chiang (1995) Structure-activity relationship of caffeic acid analogues on xanthine oxidase inhibition. *Anticancer Research*, 15, 703-707.

Table 1. IC<sub>50</sub> values of compounds 3-7 in lipid peroxidation and radical scavenging activity systems.

Compound	Lipid peroxidation systems		Radical scavenging systems	
	Fe <sup>2+</sup> /ascorbate <sup>a)</sup>	CCl <sub>4</sub> /NADPH <sup>b)</sup>	DPPH <sup>c)</sup>	Superoxide <sup>d)</sup>
3	10.8	5.9	3.4	5.8
4	5.9	4.8	2.9	2.3
5	4.1	5.2	2.2	1.3
6	5.1	8.2	2.8	1.9
7	6.6	3.2	3.1	2.1

Compounds were tested in: a) enzymatic and b) nonenzymatic lipid peroxidation, c) radical scavenging of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), and d) superoxide radical generation, systems. Each inhibitory concentration 50% (IC<sub>50</sub>) was calculated by extrapolation from concentration/effect regression lines obtained from 4-5 different concentrations. IC<sub>50</sub> values (μM) were determined only for compounds whose percentages of inhibition at 10 μM were higher than 50 %.

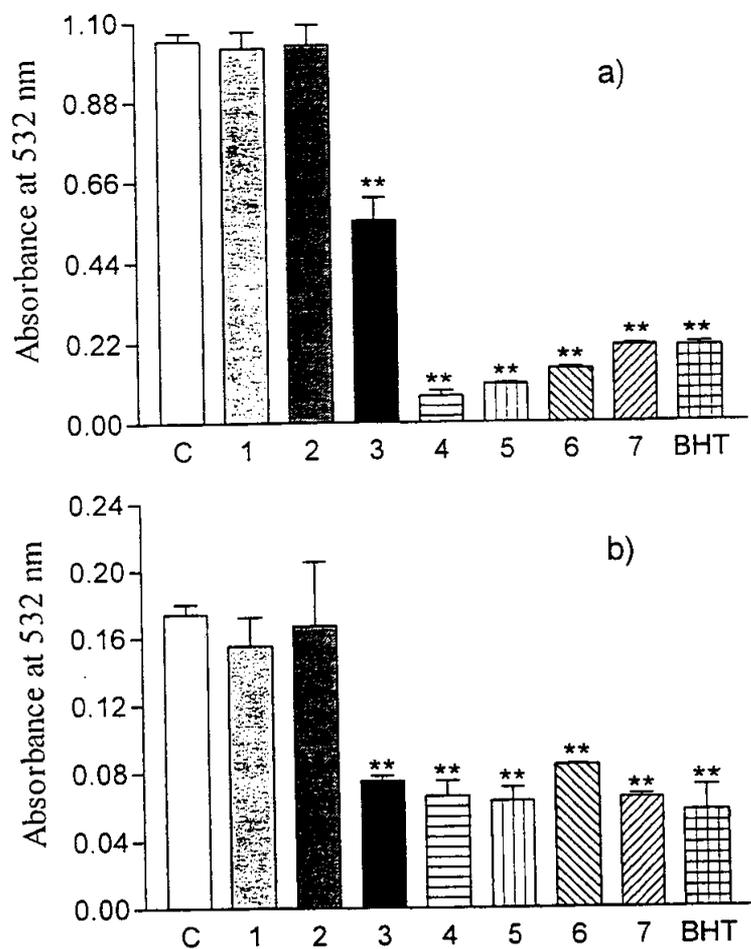


Figure 1. Effects of compounds 1-7 and the reference drug 2,6-di (*tert*-butyl)-4-methylphenol (BHT), at the final concentration of 10  $\mu$ M, on lipid peroxidation in rat liver microsomes stimulated with: a) Fe<sup>2+</sup>/ascorbate and b) CCl<sub>4</sub>/NADPH, as described under Materials and Methods. Values of absorbance directly correlate to thiobarbituric acid-reagent substances (TBARS) content. Each bar value is the mean of triplicate measurements, with vertical lines showing s.e mean, and \*\* indicates statistically significant reduction compared to control,  $P < 0.01$ .

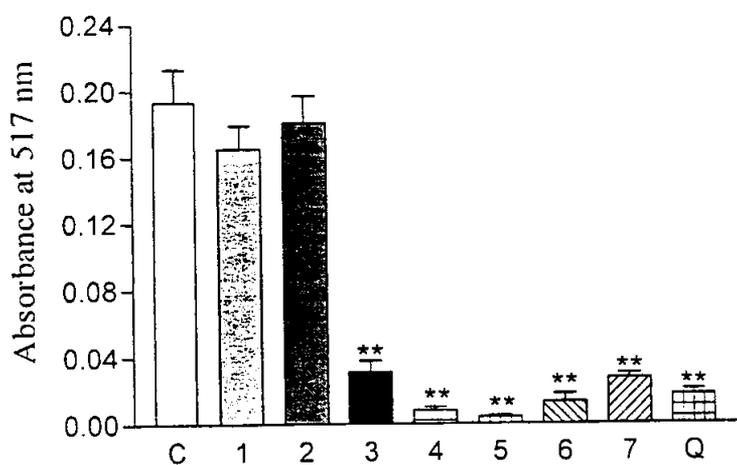


Figure 2. Scavenging effects of compounds 1-7 and the reference Quercetin-3-*O*-glucose (Q) on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. The decline in the absorbance value, measured by spectrophotometry, was due to the transformation of DPPH radical in a nonradical species. Compounds were tested at the final concentration of 10  $\mu$ M. Scavenging activity is shown as the mean  $\pm$  s.e.m., and \*\* indicates statistically significant reduction compared to control,  $P < 0.01$ .

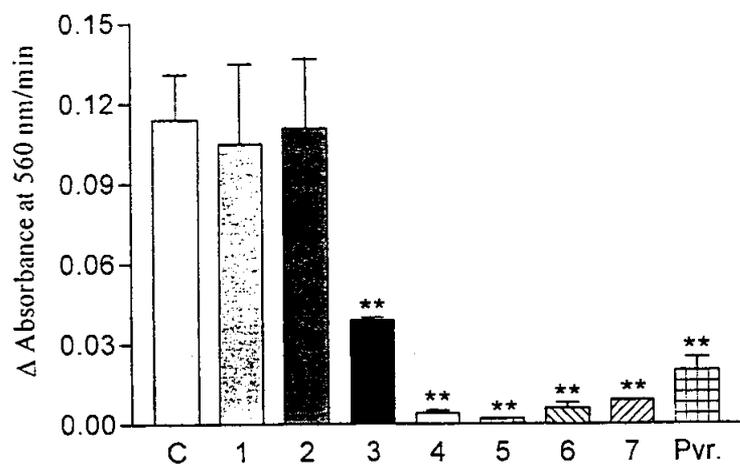


Figure 3. Activity of compounds 1-7 and the reference drug pyrogallol, as scavengers of superoxide anion. Results of nitroblue tetrazolium reduction are expressed as the increase in absorbance per min. The final concentration of compounds was 10  $\mu$ M. Each value is the mean of triplicate measurements  $\pm$  s.e.m. \*\* indicates statistically significant reduction compared to control,  $P < 0.01$ .

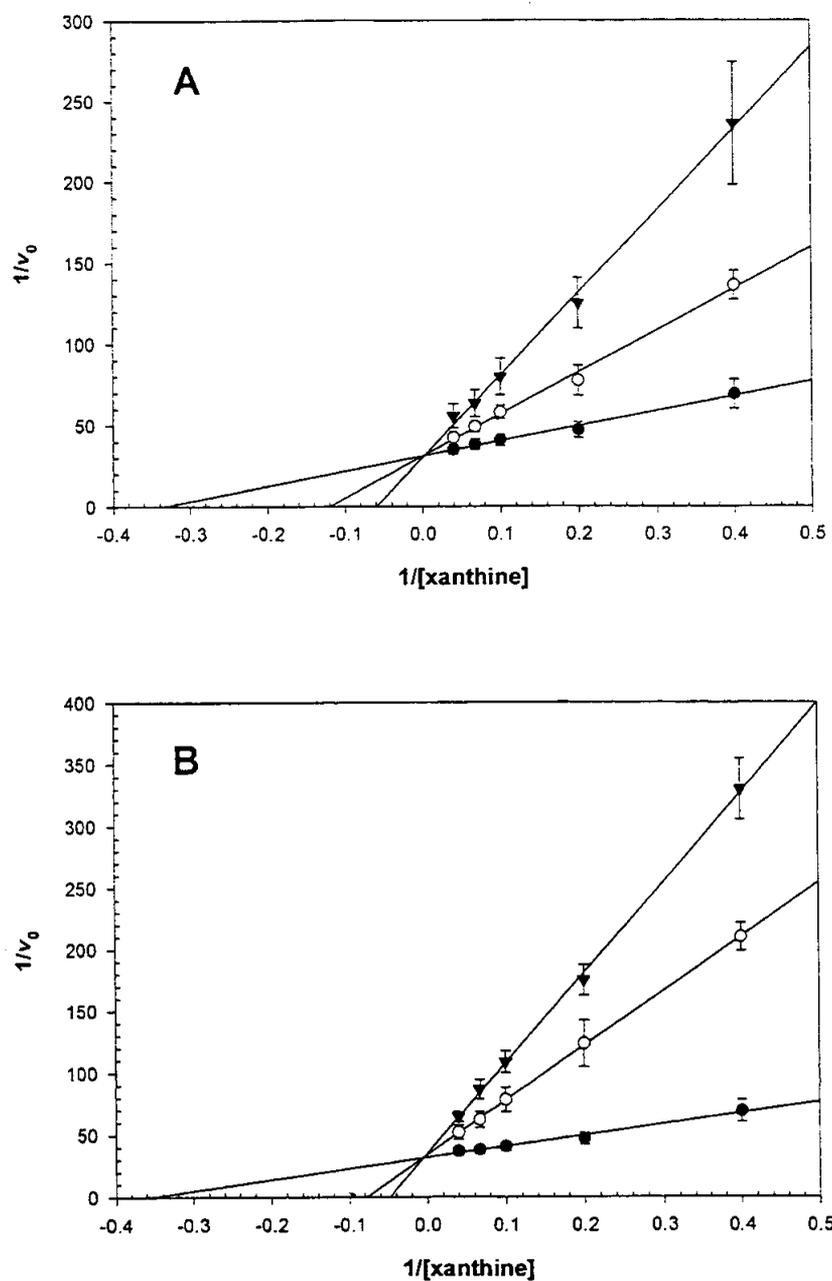
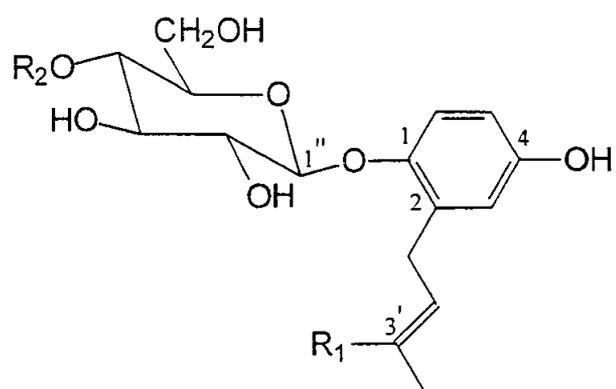
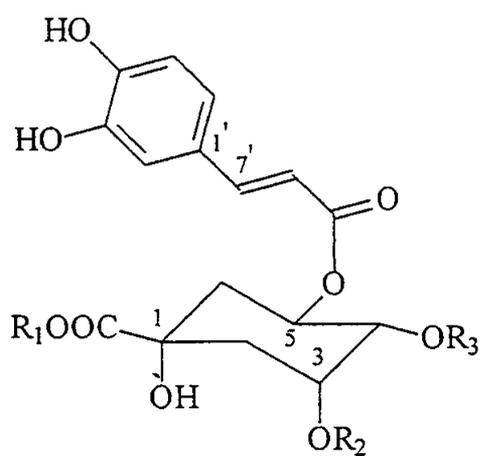


Figure 4. Lineweaver-Burk plots of the inhibition of xanthine oxidase. Enzyme activity was measured using 2.5, 5, 10, 15 and 25  $\mu\text{M}$  of xanthine as a substrate. The initial rates ( $v_0$ ) were determined on the basis of the rate of increase in absorbance at 295 nm from 0.5 to 2.5 min. A) compound 4 at 0 ( $\bullet$ ), 7.5 ( $\circ$ ), and 15 ( $\blacktriangledown$ )  $\mu\text{M}$ ; B) compound 5 at 0 ( $\bullet$ ), 0.9 ( $\circ$ ), and 1.8 ( $\blacktriangledown$ )  $\mu\text{M}$ . The data represent the mean  $\pm$  SD of three different experiments.



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
(1)	CH <sub>3</sub>	H
(2)	CH <sub>2</sub> OH	H
(3)	CH <sub>3</sub>	caffeoyl



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
(4)	CH <sub>3</sub>	caffeoyl	H
(5)	CH <sub>3</sub>	H	caffeoyl
(6)	H	caffeoyl	H
(7)	H	H	caffeoyl

1 PK 1 04-76 54 84770

---

## FREE RADICAL RESEARCH

---

### FOUNDING EDITOR

Professor Joe V. Bannister

### EDITORIAL BOARD

A. Basal (Netherlands)  
S. Block (USA)  
Y. M. Darty-Jama (USA)  
R. Dean (Australia)  
A. T. Diplock (UK)  
K. Oikarainen (USA)  
H. Esterbauer (Austria)  
M. B. Gisham (USA)  
J. M. C. Gutteridge (UK)  
B. Kalyanaraman (USA)  
N. L. Kinsky (USA)  
E. Niki (Japan)  
S. Omerius (Sweden)  
D. Rice-Evans (UK)  
M. T. Smith (USA)  
S. Steenken (Germany)  
P. Stocker (Australia)  
N. Taniguchi (Japan)

### MANAGING EDITORS

Professor Barry Halliwell  
Pharmacology Group  
University of London King's College  
Chelsea Campus  
Manresa Road, London SW3 6LX  
UK

Tel: +44 (0)171 333 4860  
Fax: +44 (0)171 333 4549

Professor Helmut Sies  
Institut für Physiologische Chemie I  
Heinrich-Heine-Universität  
Postfach 101007  
D-40001 Düsseldorf  
Germany

Tel: +49 211 811 2707  
Fax: +49 211 811 3029  
e-mail: helmut.sies@uni.duesseldorf.de

March 22, 2002

Re: FRREN-0206

Dear Dr. Rios:

I acknowledge receipt of your manuscript entitled:

"Phenolic methylquinates from Phagnalon are competitive inhibitors of xanthine oxidase and impair lipid peroxidation"

which is receiving attention.

With best regards,



Etsuo Niki  
Human Stress Signal Research Center  
1-8-31 Midorigaoka, Ikeda, Osaka  
563-8577 Japan  
Tel: 0727-51-9991  
Fax: 0727-51-9964  
e-mail: [etsuo-niki@aist.go.jp](mailto:etsuo-niki@aist.go.jp)

p.s. Helmut Sies asked me to handle your paper.

### HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS

Australia, Canada, China, France, Germany, India, Japan, Luxembourg, Malaysia, The Netherlands, Russia, Singapore, Switzerland, Taiwan, United Kingdom.

ARTÍCULO 6

**“Effects of caffeoyl conjugates of isoprenyl-hydroquinone glucoside  
and quinic acid on leukocyte function”**

*Life Sciences* (enviado)

## Effects of Caffeoyl Conjugates of Isoprenyl-hydroquinone Glucoside and Quinic Acid on Leukocyte Function

Luis Góngora<sup>1</sup>, Rosa María Giner<sup>1</sup>, Salvador Máñez<sup>1</sup>, María del Carmen Recio<sup>1</sup>, Guillermo Schinella<sup>2</sup>, José Luis Ríos<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departament de Farmacologia. Universitat de València. Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia (Spain)

<sup>2</sup>Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata, Calle 60 y 120, 1900 La Plata (Argentina)

### Abstract

The activity of three prenylhydroquinone glucosides (1-3) and four caffeoylquinic esters (4-7), obtained from *Phagnalon rupestre*, on elastase release, myeloperoxidase activity and superoxide and leukotriene B<sub>4</sub> production from polymorphonuclear leukocytes was determined. 4,5-Dicaffeoylquinic acid strongly inhibited elastase release with an IC<sub>50</sub> value of 4.8 μM. Methylated caffeoylquinic derivatives were the most potent inhibitors of myeloperoxidase (IC<sub>50</sub> near 60 μM), whereas both methylated and free carboxyl isomers inhibited superoxide production with similar potency (IC<sub>50</sub> between 27 and 42 μM). The monocaffeoyl conjugate of prenylhydroquinone glucoside (3), the most potent inhibitor of leukotriene B<sub>4</sub> production (IC<sub>50</sub> = 33 μM), possess a mixed hydroquinone-caffeoyl character that could be considered as a potential anti-inflammatory entity.

Suggested section heading: Immunology

Key words: phenolic compounds, leukocyte, elastase, myeloperoxidase, superoxide, leukotriene.

\*Corresponding senior author Tel./Fax: +34-963864973. *E-mail*: riosjl@uv.es

## Introduction

Polymorphonuclear leukocytes (PMNL), and neutrophils particularly, are cells with pivotal importance in the defence system and they are the earliest cell type that turn to the inflammation site to try to remove the pathogen agent. It is also a useful tool for the *in vitro* study of some inflammatory parameters due to the easy measurement of lysosomal enzymes, products of arachidonic acid metabolism, and reactive oxygen species (ROS). Among neutrophil proteolytic enzymes, elastase is well known for its ability to cleave many proteins with important biological functions, such as fibrous elastin (which plays a mechanical function in lungs, arteries, skin and ligaments), collagen, fibronectin, laminin and cartilage proteoglycans. In addition of the physiological function of neutrophil elastase in bacterial digestion, PMNL apoptosis and migration from blood vessel to tissue, is also suggested to be involved in some pathological inflammatory states, such as pulmonary emphysema, rheumatoid arthritis, adult respiratory distress syndrome (ARDS) and infectious diseases [1].

In the inflammatory process against bacterial infection, one of the many events that take place in the neutrophil is the formation of the powerful oxidant and microbicidal agent hypochlorous acid by oxidation of the halure by  $H_2O_2$ . This reaction is catalysed by the lysosomal myeloperoxidase (MPO) enzyme, present in the azurophilic granules of this cell [2].

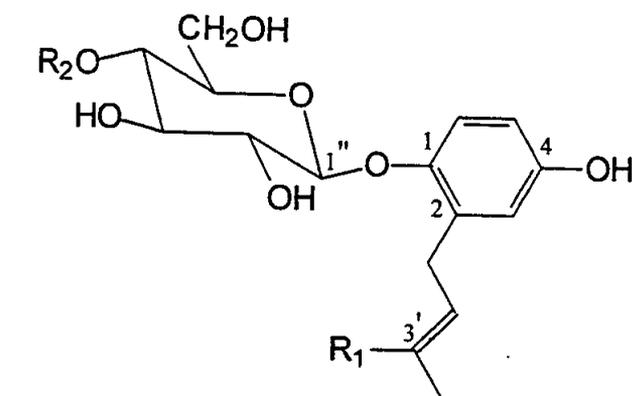
Another important neutrophil mediator in inflammatory process is leukotriene  $B_4$  ( $LTB_4$ ), a product of the 5-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. It acts as potent leukocyte chemotactic, and has been shown to participate in cell adhesion, superoxide production, calcium translocation and in release of hydrolytic enzymes [3]. This 5-LOX product has been implicated in several diseases such as rheumatoid arthritis, gout, cystic fibrosis, psoriasis and ischemia/reperfusion cardiac damage [4].

After cell surface activation of neutrophils in addition to mentioned above synthesis and release of arachidonic acid products, secretion of lysosomal enzymes and many other events, an increase of oxygen consumption occurs. It leads to generation of many reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anion. It is well known that ROS are implicated in numerous pathological states including inflammation, rheumatoid arthritis, cancer, atherosclerosis, anaemia, age-related degeneration, parkinsonism and in ischemia-reperfusion tissue injury [5].

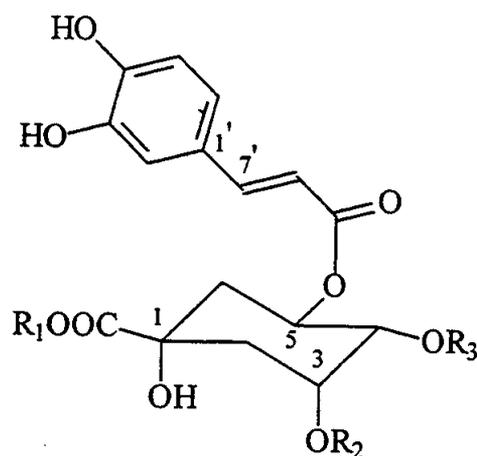
In our previous works [6,7], we have described the isolation and identification from *Phagnalon rupestre* (L.) DC (Asteraceae) of seven phenolic compounds, three hydroquinone glucosides, 1-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3',3'-dimethylallyl) benzene (1), 1-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3'-hydroxymethyl-3'-methylallyl) benzene (2), 1-*O*-(4''-*O*-caffeoyl)- $\beta$ -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3',3'-dimethylallyl) benzene (3); and four dicaffeoylquinic derivatives, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (4), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (5), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (6) and 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (7). Also, we have described the effects of these compounds on a contact hypersensitivity model [Planta Med] and we have recently evaluated their antioxidant activities on different models such as enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation, radical scavenger activity and inhibition of xanthine oxidase enzyme (data not published). Considering these results, the present study undertakes the assessment of the "*in vitro*" activity of compounds 1-7 on the neutrophil, a biological system that allows the evaluation of some functions relative to the inflammatory process.

## Methods

Chemicals: Test compounds (1-7, Figure 1) were isolated from *Phagnalon rupestre* (Asteraceae) as previously described [6,7]. *N*-*tert*-Butoxy-carbonylalanine-*p*-nitrophenylester (Boc-Ala-OPhNO<sub>2</sub>), CaCl<sub>2</sub>, calcium ionophore A23187, dimethylformamide, Hank's balanced salt solution (HBSS), nitroblue tetrazolium (NBT), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), phosphate buffer saline (PBS), prostaglandin B<sub>2</sub> (PGB<sub>2</sub>), 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), tetramethylbenzidine (TMB), trypan blue, and other chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA. HPLC solvents were provided by J.T. Baker, Holland.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
(1)	CH <sub>3</sub>	H
(2)	CH <sub>2</sub> OH	H
(3)	CH <sub>3</sub>	caffeoyl



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
(4)	CH <sub>3</sub>	caffeoyl	H
(5)	CH <sub>3</sub>	H	caffeoyl
(6)	H	caffeoyl	H
(7)	H	H	caffeoyl

Figure 1. Chemical structures of compounds 1-7.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay [8]: The MTT assay was used as a criterion of cell cytotoxicity. The assay is based on the capacity of mitochondrial dehydrogenase enzymes in living cells to convert the yellow water-soluble substrate MTT into a dark blue formazan product which is insoluble in water. The coloured metabolite was dissolved in DMSO in a ultrasonic bath and measured using Labsystems Multiskan MCC/340, at 490 nm. Before doing the assay, polymorphonuclear leukocytes (PMNL,  $10^6$  cells) were preincubated at 37°C for 30 min with phosphate-saline buffer (PBS) pH 7.4, containing 100 µg/ml of the test compound. Controls received vehicle and correspond to 100% viability.

Elastase release assay [9]: PMNL were obtained by diluting human buffy-coats with PBS (1:3) and centrifuging twice (10 min, 300 g), discarding the supernatants and keeping the PMNL rich pellets. After centrifuging 10 min at 300 g with lyse-medium, the resulting pellet was washed twice, and finally resuspended in Hank's balanced salt solution (HBSS) with  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM) and  $\text{Mg}^{2+}$  (0.5 mM). For elastase release assay,  $1.25 \times 10^6$  PMNL were suspended in 500 µl HBSS containing  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  and preincubated at 37°C for 5 min. Then, the cells were incubated for 5 min in the presence of the test compounds at different concentrations (0.4-200 µM). Five min later, cells were stimulated by 5 µl of TPA (65 µg/mL). After 10 min, the mixture was placed on ice. Then, it was centrifuged at 4000 rpm and the supernatant (200 µl) was placed in a 96-well microtiter plate with the substrate Boc-Ala-O $\text{PhNO}_2$ . After incubation at 37°C for 30 min, the enzyme activity was determined colorimetrically using a Labsystem Multiscan MCC/340 plate reader set to measure absorbance at 414 nm. In order to determine the influence of compounds on enzyme activity, supernatant of TPA-stimulated PMNL ( $1 \times 10^6$ ) were incubated with test compounds at final concentration of 100 µM at 37°C for 15 min. Then the procedure followed as described above.

Myeloperoxidase assay: We used the method described by De Young *et al.* (1989) [10] with slight modifications. Human PMNL ( $20 \times 10^6$ ) were stimulated by 80 µl of TPA (65 µg/mL) and incubated at 37°C for 30 min. After this time, 30 µl of a supernatant aliquot corresponding to  $1.25 \times 10^6$  cells in HBSS, was added to a mixture containing 100 µl of Dulbecco's PBS, 85 µl of sodium phosphate buffer (0.22 M; pH 5.4) and 15 µl of  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.017 % in a 96-well microtiter plate. The reaction was started by adding 1.84 mM tetramethylbenzidine (TMB) in 8% aqueous dimethylformamide. The mixture was incubated for 3 min at 37°C and then placed on ice. The reaction was stopped with 1.46 M NaOAc (pH 3). Enzyme activity was determined colorimetrically using a Labsystem Multiscan MCC/340 plate reader set to measure absorbance at 630 nm. The percentage of myeloperoxidase activity reduction was calculated with respect to the TPA control.

Superoxide radical generation by human leukocytes: The protocol described by Montesinos *et al.* (1995) was followed [11].  $2.5 \times 10^6$  PMNL obtained as described above, were suspended in 500 µl HBSS containing  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  in a 96-well microtiter plate. After addition of nitroblue tetrazolium (NBT) and test compounds at different concentrations, and the mixture was incubated at 37°C for 5 min. Superoxide release was induced by addition of 5 µL TPA (f.c. 1 µM) and after incubation at 37°C for 10 min, the mixture was centrifuged at 3000 rpm. The precipitate was dissolved in 500 µL DMSO-CIH (95:5) in an ultrasonic bath and measured using a Labsystem Multiscan MCC/340 at 560 nm.

Inhibition of the production of leukotriene B<sub>4</sub> from rat polymorphonuclear leukocytes: The protocol described by Safayhi *et al.* (1995) was followed [12]. Cells were harvested after intraperitoneal injection of glycogen (1 mg/g body weight in 10 ml of Dulbecco's PBS, 37°C) and washed by centrifugation (300 g, 10 min at room temperature, twice). The cell viability of the elicited rat peritoneal leukocytes was assessed before each experiment using the trypan blue exclusion test. Only harvested cells with a viability greater than 95% were employed. The cells ( $5 \times 10^6$ ) were resuspended in 1 ml PBS containing 1 g/L glucose and preincubated for 5 min with the test compounds at room temperature. Then, the reaction was started by addition of ionophore A23187 and Ca<sup>2+</sup> (1.9  $\mu$ M and 1.8 mM final concentrations, respectively). After 5 min at 37°C, the reaction was stopped with 1 mL of methanol/1N HCl (97:3), and 200 ng of prostaglandin B<sub>2</sub> (PGB<sub>2</sub>) was added as an internal standard. After centrifugation (5 min, 10000 g), the samples were applied to C-18 SPE columns (100 mg), which were conditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of water. The columns were washed with 1 mL of water and 1 mL of 25% methanol. The 5-LOX metabolites were extracted with 300  $\mu$ L of methanol and 100  $\mu$ L of the extract was analyzed by HPLC.

HPLC-DAD analysis was performed on a Merck-Hitachi system (Intelligent Pump L-6200) equipped with an L-7455 Diode Array Detector and an L-7200 Autosampler, with an injection valve (Reodyne) and a loop of 100  $\mu$ L. Precolumn Lichrospher<sup>®</sup> C18 (4×4 mm, 5  $\mu$ m, Merck), column Lichrospher<sup>®</sup> C18 (250×4 mm, 5  $\mu$ m, Merck), Software HSM-7000 (Merck-Hitachi) were used. Elution profile was: 0-27 min, 100% A; 27.1-27.6 min, 0% A; 27.7-40 min, 100% A, being the eluents MeOH/H<sub>2</sub>O (74:26) acidified with trifluoroacetic acid (TFA) 0.007% (A) and MeOH (B). Flow rate 1 ml/min. The production of 5-LOX metabolites is expressed as percentages of the areas of LTB<sub>4</sub> with respect to the controls. Three or more independent experiments were performed.

Statistical analysis: Data were expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's *t*-test for multiple comparisons. Statistical significance is expressed as \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ . The inhibitory concentration 50% (IC<sub>50</sub>) was calculated from the concentration/effect regression lines.

## Results

At first, it was confirmed by the MTT test that none of the test compounds at 100  $\mu$ M was cytotoxic (data not shown). In the elastase release assay, the absorbance due to *p*-nitrophenol decreased in the presence of all compounds at 100  $\mu$ M, being the 3,5-dicaffeoylquinic conjugates **4** and **6** the most active compounds (Table 1). However, the 4,5-dicaffeoylquinic conjugate (**7**) displayed the highest potency with IC<sub>50</sub> value of 4.8  $\mu$ M. Compound **3** showed a moderate activity while the other hydroquinones were not significantly active. After having examined the possibility that the effect observed were due to an enzymatic activity inhibition, only compound **3** managed to reduce the enzymatic activity by more than one third (Table 1).

Compound	Absorbance at 630 nm	IC <sub>50</sub>
Control	0.594 ± 0.020	
1	0.659 ± 0.061	
2	0.501 ± 0.009	
3	0.303 ± 0.010 **	81
4	0.239 ± 0.029 **	60
5	0.242 ± 0.024 **	61
6	0.349 ± 0.020 **	146
7	0.323 ± 0.050 **	133

Table 1. Effect of compounds (1-7) isolated from *P. rupestre* on myeloperoxidase activity assay. Results of tetramethylbenzidine oxidation are expressed as absorbance at 620 nm. The final concentration of compounds was 100 µM. Control group received vehicle only. Each value is the mean of triplicate measurements ± s.e.m. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01. Inhibitory concentration 50 % (IC<sub>50</sub>) values were calculated by extrapolation from concentration/effect regression lines obtained from 3-4 different concentrations, and were determined only for compounds whose percentages of inhibition at 100 µM were higher than 40 %.

In the myeloperoxidase activity assay, only compounds 3-5 exhibited inhibition percentages of at least 50% (Table 2). The IC<sub>50</sub> values of methyl quinates 4 and 5 were of 60 and 61 µM, respectively.

Compound	Release assay <sup>a)</sup>		Activity assay <sup>b)</sup>
	Absorbance at 414 nm	IC <sub>50</sub> <sup>c)</sup>	Absorbance at 414 nm
Control	0.151 ± 0.014		0.139 ± 0.009
1	0.114 ± 0.010		0.141 ± 0.008
2	0.124 ± 0.007		0.138 ± 0.010
3	0.079 ± 0.017 *		0.086 ± 0.017
4	0.019 ± 0.007 **	8.9	0.114 ± 0.014
5	0.060 ± 0.011 **	47	0.131 ± 0.010
6	0.034 ± 0.003 **	9.9	0.129 ± 0.015
7	0.048 ± 0.009 **	4.8	0.105 ± 0.014

Table 2. Effect of compounds (1-7) isolated from *P. rupestre* on elastase release assay and elastase activity assay. Results of N-tertbutoxycarboxyalanin-p-nitrophenylester (Boc-Ala-OPhNO<sub>2</sub>) cleavage by elastase are expressed in absorbance of coloured compound p-nitrophenol at 414 nm. <sup>a)</sup> Assay upon protease release from neutrophils. <sup>b)</sup> Assay upon protease activity of the released protease from neutrophils. The final concentration of compounds was 100 µM. Control group received vehicle only. Each value is the mean of triplicate measurements ± s.e.m. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01 <sup>c)</sup> Inhibitory concentration 50 %. Each IC<sub>50</sub> value was calculated by extrapolation from concentration/effect regression lines obtained from 5-6 different concentrations, and were determined only for compounds whose percentages of inhibition at 100 µM were higher than 50 %.

Only the four dicaffeoylquinic derivatives caused a significant inhibition of superoxide radical production by human PMNL, showing percentages of inhibition ranging 75-82% (Figure 2). The  $IC_{50}$  values of caffeoylquinic derivatives 4, 5, 6 and 7 were 31.7, 27.0, 42.5 and 38.4  $\mu$ M, respectively.

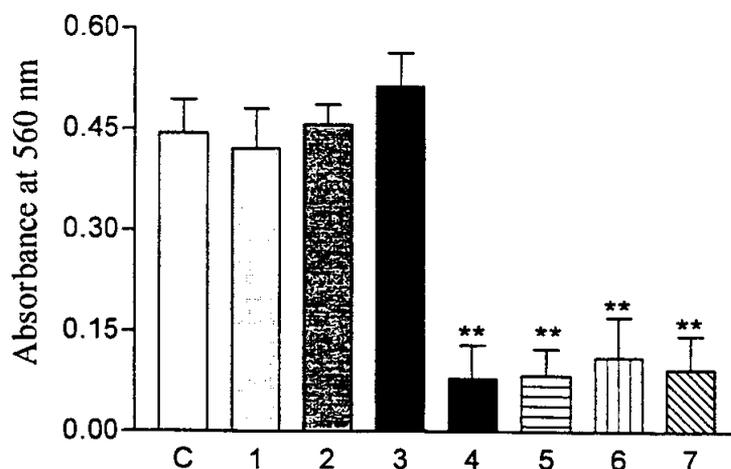


Figure 2. Effect of compounds (1-7) on superoxide production by neutrophils. Results of nitroblue tetrazolium reduction by superoxide radical are expressed in absorbance at 550 nm. The final concentration of compounds was 100  $\mu$ M. Control group received vehicle only. Each bar value is the mean of triplicate measurements  $\pm$  s.e.m. \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01.

The production of leukotriene  $B_4$  from rat peritoneal leukocytes was considerably reduced by caffeoyl-hydroquinone 3, with a 83 % inhibition at 100  $\mu$ M (Figure 3). The methylated dicaffeoylquinic isomers 4 and 5 exerted a lower inhibition (56 and 43 %, respectively), whereas the rest of compounds were inactive. The  $IC_{50}$  values were 35.6, 81.5 and 126  $\mu$ M for 3, 4 and 5, respectively.

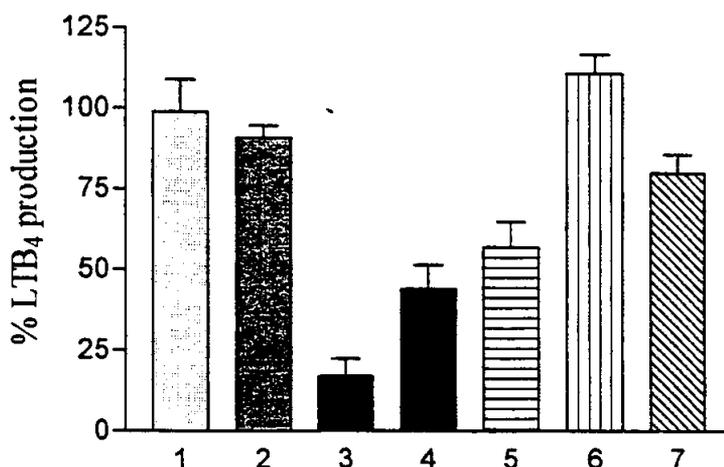


Figure 3. Effect of compounds (1-7) on  $LTB_4$  production. Results are expressed as percentage of  $LTB_4$  production with respect to control. The final concentration of compounds was 100  $\mu$ M. Each bar value is the mean of triplicate measurements  $\pm$  s.e.m. Inhibitory concentration 50 % ( $IC_{50}$ ) values were calculated by extrapolation from concentration/ effect regression lines obtained from 3-4 different concentrations, and were determined only for compounds whose percentages of inhibition at 100  $\mu$ M were higher than 40 %.

## Discussion

Among the activities tested, the highest potencies correspond to the four caffeoylquinic compounds, when tested against the release of leukocyte elastase. This enzyme is the main neutrophil metalloprotease and is tightly stored in the azurophilic granules [13]. As the inhibitory activity of the enzyme itself was negligible, the results indicate that a marked reduction of exocytosis of these intracellular granules should occur. However, compound **3** constituted an exception because it showed a moderate percentage of direct enzyme inhibition that then would be partially responsible of the activity on the release assay.

Caffeoylquinic derivatives were also the most active compounds in the inhibition of superoxide production by PMNL, with a discrete preponderance of methyl quinates **4** and **5**. These results are complementary to those obtained for the same compounds assayed in cell-free systems of generation of superoxide, remarking that compound **4** and, especially, **5** were inhibitors of xanthine oxidase (unpublished data).

As the inhibitory effects of the test compounds on the activity of the myeloperoxidase liberated from PMNL were not strong, it was not allowed to ascertain whether a reduction of this activity would increase superoxide production, as was described previously in normal and myeloperoxidase-deficient [14], and elderly subjects [15]. However, compound **3** seemed to follow this pattern, at least in comparative terms, because, having a moderate effect on myeloperoxidase, was ineffective on superoxide generation. Referring to the production of leukotriene B<sub>4</sub> production, the unique combination of one caffeoyl ester and a prenylated aryl moiety, present in compound **3**, was decisive to enhance the activity of their partial analogues. On the other hand, methylation of the carboxyl group in quinic derivatives (**4-5**) increased the effect relative to that of free acids (**6-7**). The whole set of compounds **3-7** showed antiperoxidative and free radical scavenging properties, being **3** the least active in each case (unpublished data). Combining these data with those reported in the present paper, it can be suggested that the reduction of leukotriene B<sub>4</sub> production by compounds **4-7** may be linked to their antioxidant effect, while this reason would not be applicable for **3**. Further investigations in the interaction of the latter compound with 5-lipoxygenase and leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase, the key enzymes for the synthesis of leukotriene B<sub>4</sub>, would be necessary to determine its mode of action.

This is the first time, to our knowledge, that the activity of the prenylhydroquinone glucosides and methyl esters of caffeoylquinic acid on the production of PMNL- proinflammatory mediators is reported. However, the carboxyl-free 3,5- and 4,5-dicaffeoylquinic acids (**6** and **7**, respectively) were previously described as inhibitors of the production of 5-lipoxygenase-derived metabolites of arachidonic acid, by using a TLC-autoradiography method. In this paper, it is reported that **6** and **7** inhibited leukotriene B<sub>4</sub> production in the range of 100-1000 μM, with no data of efficacy, although IC<sub>50</sub> values of 86 μM and 443 μM, respectively, were given [16]. According to our results, these compounds resulted practically inactive at 100 μM, being the discrepancy probably due to the differences in the experimental conditions.

Referring to other related compounds and their interaction with inflammatory mediators, it is noted that 3,4- and 4,5-dicaffeoylquinic acids, from *Artemisia montana* (Asteraceae), exhibited inhibitory effects of the histamine release from rat peritoneal mast cells [17]. In addition, 3,4-dicaffeoylquinic acid and its methyl ester derivative, from *Lonicera japonica* (Caprifoliaceae), strongly inhibited human platelet aggregation, being the latter a potent thromboxane biosynthesis inhibitor in platelet microsomes [18].

Recently, 4-feruloyl-5-caffeoylquinic acid and its methyl ester from *Citrus reticulata* (Rutaceae) were cited as moderate inhibitors of rat platelet 12-lipoxygenase [19].

To conclude, it can be established that caffeoyl conjugates, with cyclic polyhydroxylated compounds, either quinic acid or sugar residues, on a hydroquinone-type glycoside in this case, exert notable activity on some of the biological functions of PMNL implicated in the initiation and maintenance of inflammation, namely oxygen free radical production, liberation of hydrolytic enzymes and leukotriene formation.

### Acknowledgments

This work was supported by the Secretaría de Estado de Universidades e Investigación of the Spanish Government (grant PM98-0206). A part of the experiments was supported by CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo), from which LG was the recipient of a grant. GS is a member of CIC Provincia de Buenos Aires, Argentina. We would like to thank the Centre de Transfusió de la Comunitat Valenciana for its generous supply of processed human blood.

### References

- [1] Bieth JG. Les élastases *Journal de La Societé de Biologie* 2001; 195:173-9.
- [2] Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction *British Medical Bulletin* 1993; 49: 506-22.
- [3] Ammon HPT, Mack T, Singh GB, Safayhi H. Inhibition of leukotriene B<sub>4</sub> formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudate of *Boswellia serrata*. *Planta Medica* 1991; 57: 203-7.
- [4] Henderson WR. The role of leukotrienes in inflammation. *Annals of Internal Medicine* 1994; 121: 684-97.
- [5] Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of The American Oil Chemists' Society* 1998; 75: 199-212.
- [6] Góngora L, Giner RM, Máñez S, Recio MC, Ríos JL. New prenylhydroquinone glycosides from *Phagnalon rupestre*. *Journal of Natural Products* 2001; 64: 1111-3.
- [7] Góngora L, Giner RM, Máñez S, Recio MC, Ríos JL. *Phagnalon rupestre* as a source of compounds active on contact hypersensitivity. *Planta Medica* 2002: in press.
- [8] Mossman TJ. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Applications to proliferation and cytotoxic assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65: 55-63.
- [9] Barret AJ. Leukocyte elastase. *Methods in Enzymology* 1981; 80: 581-8.
- [10] De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Oedema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear oedema are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacological agents. *Agents and Actions* 1989; 26: 335-41.
- [11] Montesinos MC, Ubeda A, Terencio MC, Payá M, Alcaraz MJ. Antioxidant profile of mono- and dihydroxylated flavone derivatives in free radical generating systems. *Zeitschrift für Naturforschung* 1995; 50c: 552-60.
- [12] Safayhi H, Sailer S, Ammon HPT. Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid. *Molecular Pharmacology* 1995; 47: 1212-6.
- [13] Ligeti E, Mócsai A. Exocytosis of neutrophil granulocytes. *Biochemical Pharmacology* 1999; 57: 1209-14.

- [14] Neuseef WM, Metcalf JA, Root RK. Role of myeloperoxidase in the respiratory burst of human neutrophils *Blood* 1983; 61: 483-92.
- [15] Bekesi G, Kakucs R, Sandor J, Sarvary E, Kocsis I, Sprintz D, Varbiro S, Magyar Z, Hrabak A, Feher J, Szekacs B. Plasma concentration of myeloperoxidase enzyme in pre- and post-climacterial people: related superoxide anion generation. *Experimental Gerontology* 2001; 37: 137-48.
- [16] Kimura Y, Okuda H, Okuda T, Hatano T, Arichi S. Studies of the activities of tannins and related compounds, X. Effects of caffetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Natural Products* 1987; 50: 392-9.
- [17] Kimura Y, Okuda H, Okuda T, Hatano T, Agata I, Arichi S. Studies of the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs, VI. Inhibitory effects of caffeoylquinic acids on histamine release from rat peritoneal mast cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1985; 33: 690-6.
- [18] Chan WC, Hsu FL. Inhibition of platelet activation and endothelial cell injury by polyphenolic compounds isolated from *Lonicera japonica* Thumb. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1992; 45: 307-12.
- [19] Nogata Y, Sekiya K, Ohta H, Kisumoto KI, Ishizu T. Inhibitors of platelet lipooxygenase from Ponkan fruit. *Phytochemistry* 2001; 56: 729-32.



## *Life Sciences*

Published by Elsevier Science Inc.  
655 N. Alvernon Way, Suite 119  
Tucson, Arizona 85711  
Phone: (520) 321-7778  
Fax: (520) 321-7781

March 28, 2002

Dr. Jose-Luis Rios-Canavate  
Dept. de Farmacologia  
Facultat de Farmacia  
Universitat de Valencia  
Avda. Vincent Andres Estelles s/n.  
46100 Burjassot, (Valencia)  
Spain

RE: Manuscript #LS-0194-02

Dear Dr. Rios-Canavate,

Thank you for submitting your manuscript:

Effects of caffeoyl conjugates of isoprenyl-hydroquinone glucoside and quinic acid on leukocyte function

to Life Sciences. Please include a reference to the manuscript number #LS-0194-02 in all communications with the journal offices regarding your paper.

Our recorded date of submission is 03/28/2002. You will be hearing from us as soon as possible with regard to the outcome of the review process.

Sincerely yours,

LIFE SCIENCES