



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

**ÉTERES ALQUÍLICOS DERIVADOS DE POLIFENOLES DEL OLIVO.  
SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.**

Andrés Madrona Mojarro

Sevilla, Diciembre de 2011



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

**ÉTERES ALQUÍLICOS DERIVADOS DE POLIFENOLES DEL OLIVO.  
SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.**

Memoria presentada por el Lcdo. Andrés Madrona Mojarro para optar  
al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

Sevilla, Diciembre de 2011



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

D. José Luis Espartero Sánchez, Profesor Titular de Universidad, adscrito al Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral "*Éteres alquílicos derivados de polifenoles del olivo. Síntesis y evaluación de su actividad antioxidante*", realizada por D. Andrés Madrona Mojarro para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia, ha sido llevada a cabo bajo su dirección.

En Sevilla, 20 de diciembre de 2011

Fdo. José Luis Espartero Sánchez

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento:

A José Luís, por su paciencia, sus consejos, por compartir sus conocimientos y por cederme su tiempo. Desde el primer día que llegué al Departamento has hecho que me sienta uno más. Gracias por todo.

Al Dr. D. Felipe Alcudia González, por facilitarme la realización de este trabajo en su grupo de investigación.

A todo el equipo del Departamento, por hacerme sentir uno más en todo momento y por la ayuda prestada cuando ha sido necesaria. En especial a las Dras. Dña. M<sup>a</sup> Eugenia Blanco y Dña. Margarita Vega, que siempre se han interesado por mí.

A la Dra. Dña. Mariana Trujillo Pérez-Lanzac le agradezco sus sabios consejos, su continuo apoyo. Gracias por templarme y saber sacar lo mejor de mí en cada momento. Gracias por tu sinceridad y por hacerme ver las cosas tal y como son.

A todos los miembros del servicio de Resonancia Magnética Nuclear del CITIUS, por su buen hacer y disponibilidad.

Al Dr. D. Manuel Angulo, por tener siempre un hueco para mí y enseñarme, o al menos intentarlo, los entresijos de la RMN.

Esprimo la mia gratitudine al Prof. Giovanni Zappia per consentire un soggiorno nel suo gruppo di ricerca.

A la Dra. Dña. Raquel Mateos Briz, por su participación en los resultados de esta memoria.

A Gema, con quien he compartido muchas horas de laboratorio, por su simpatía y amabilidad.

A Rosa Cert, quien siempre ha estado disponible y cuya ayuda ha sido muy importante para mí.

No me quiero olvidar de quienes han compartido conmigo el camino desde sus comienzos, Nacho y Jose, sin olvidar a Elena, Ahmed y Carlos que llegaron más tarde pero parecía que llevaban con nosotros siempre. Lo hemos pasado bien.

A mis amigos que, si bien no comprenden exactamente mi trabajo, siempre se han interesado por él y preocupado por mí.

Doy las gracias a mis padres por todo lo que me han dado, por saber inculcarme los valores del trabajo y el esfuerzo. Gracias por apoyarme siempre al 100% y comprender mis decisiones o, al menos, intentarlo.

A mis hermanos, que siempre han sido una referencia para mí y me han ayudado a ser la persona que soy.

Por supuesto a Rocío, con quien he formado una familia. Gracias por estar a mi lado **incondicionalmente**. Me has apoyado en los momentos más difíciles y has sabido estar ahí. Si hay alguien dura y fuerte, esa eres tú. Gracias por Celia, el motor de nuestras vidas.

*A Rocío*  
*A Celia*



## ***ÍNDICE***



# ÍNDICE

<b>1. Introducción</b>	5
<b>2. Antecedentes</b>	11
2.1. <i>La oxidación y los antioxidantes</i>	13
2.2. <i>Los compuestos fenólicos del olivo y sus productos</i>	18
2.3. <i>Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos del aceite de oliva</i>	25
2.4. <i>Características nutricionales y farmacológicas de los polifenoles del AOV</i>	28
2.5. <i>Obtención de hidroxitirosol</i>	30
2.5.1. <i>Aislamiento a partir de residuos del olivar</i>	30
2.5.2. <i>Síntesis de hidroxitirosol</i>	
2.6. <i>Derivados sintéticos de hidroxitirosol y tirosol</i>	33
2.7. <i>Relación estructura/actividad de los antioxidantes fenólicos</i>	38
2.7.1. <i>Influencia del número de hidroxilos fenólicos</i>	38
2.7.2. <i>Influencia del número de grupos metoxilo</i>	39
2.7.3. <i>Influencia de la longitud y naturaleza de la cadena alquílica</i>	41
2.8. <i>Métodos de evaluación de la actividad antioxidante</i>	44
2.8.1. <i>Métodos basados en mecanismos ET</i>	44
2.8.2. <i>Métodos basados en mecanismos HAT</i>	47
2.8.3. <i>Determinación de la oxidación lipídica</i>	49
<b>3. Objetivos</b>	51
3.1. <i>Síntesis de éteres alquílicos derivados de compuestos fenólicos presentes en el olivo</i>	54
3.2. <i>Síntesis de hidroxitirosol y nuevas formas protegidas</i>	54
3.3. <i>Evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos sintetizados mediante métodos químicos</i>	55
3.3.1. <i>Método Rancimat®</i>	55
3.3.2. <i>Método FRAP</i>	55
3.3.3. <i>Método ABTS</i>	56
3.3.4. <i>Método ORAC</i>	56
3.4. <i>Determinación de la actividad biológica de los compuestos sintetizados</i>	56

3.4.1.	Evaluación de la lipoperoxidación lipídica de la membrana de los glóbulos rojos y de la hemólisis oxidativa	56
3.4.2.	Estudio de la actividad anticancerígena	57
<b>4.</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>59</b>
4.1.	<i>Sustancias comerciales</i>	61
4.2.	<i>Sustancias de partida</i>	62
4.2.1.	Aislamiento y purificación de hidroxitirosol a partir de alperujo	62
4.2.2.	Protección de los OH fenólicos	63
4.2.3.	Síntesis de 2-(3,4-dioximetilidén)feniletanol ( <b>82</b> )	64
4.3.	<i>Síntesis de las nuevas sustancias</i>	65
4.3.1.	Reacción de alquilación. Procedimiento general	65
4.3.2.	Reacción de hidrogenólisis. Procedimiento General	79
4.3.3.	Reacción de alquilación de 2(3,4-dioximetilidén)feniletanol ( <b>82</b> )	91
4.3.4.	<i>Síntesis de 2-metoxi-5-(2'-metoxietil)fenol (143)</i>	95
4.3.5.	Synthesis of hydroxytyrosol and its protected forms via Baeyer- Villiger oxidation	99
4.4.	<i>Aparatos y procedimientos analíticos generales</i>	102
4.5.	<i>Determinación de la estabilidad oxidativa de matrices lipídicas</i>	104
4.5.1.	Matriz lipídica	104
4.5.2.	Purificación de la matriz lipídica	105
4.5.3.	Determinación de la composición en ácidos grasos	106
4.5.4.	Determinación de $\alpha$ -tocoferol	
4.5.5.	Oxidación acelerada de matrices lipídicas. Método Rancimat®	108
4.6.	<i>Estimación de la capacidad antioxidante in vitro</i>	109
4.6.1.	Capacidad reductora (Método FRAP)	109
4.6.2.	Capacidad de secuestro de radicales libres	110
4.7.	<i>Determinación de la actividad biológica en glóbulos rojos</i>	114
4.7.1.	Preparación de los glóbulos rojos	114

4.7.2.	Evaluación de la lipoperoxidación lipídica de la membrana de los glóbulos rojos	114
4.7.3.	Determinación de la Hemólisis Oxidativa	115
4.8.	<i>Evaluación de la citotoxicidad mediante la técnica colorimétrica MTT</i>	116
4.8.1.	Ensayo con células HT-29 de adenocarcinoma de colon	117
4.8.2.	Ensayo con células A-549 de adenocarcinoma de pulmón	118
4.8.3.	Ensayo con células MCF-7 de adenocarcinoma de mama	119
<b>5.</b>	<b>Resultados y Discusión</b>	121
5.1.	<i>Preparación y caracterización de éteres alquílicos derivados de compuestos fenólicos presentes en el olivo</i>	123
5.1.1.	Caracterización de los alquil éteres derivados de hidroxitirosol	125
5.1.2.	Caracterización de los alquil éteres derivados de tirosol	132
5.1.3.	Caracterización de los alquil éteres derivados de alcohol homovanílico	138
5.2.	<i>Preparación y caracterización de metilidendioxi derivados de hidroxitirosol</i>	143
5.2.1.	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	144
5.2.2.	Espectrometría de masas	148
5.3.	<i>Ensayo de protección regioselectiva. Obtención del 3-O-bencil hidroxitirosol</i>	149
5.3.1.	Primera etapa: Protección regioselectiva	150
5.3.2.	Segunda etapa: Reacción de alquilación	157
5.3.3.	Tercera etapa: Eliminación del grupo protector	158
5.4.	<i>Síntesis de hidroxitirosol y sus nuevas formas protegidas</i>	161

5.4.1.	Synthesis of hydroxytyrosol (1)	161
5.4.2.	Synthesis of protected forms of hydroxytyrosol	163
5.5.	<i>Estimación de la lipofilia de los éteres alquílicos derivados de hidroxitirosol</i>	164
5.5.1.	Estimación del Factor de Apolaridad (F.A.)	165
5.5.2.	Cálculo del logaritmo del coeficiente de reparto (CLogP)	165
5.6.	<i>Evaluación de la actividad antioxidante por métodos químicos</i>	167
5.6.1.	Estabilidad oxidativa en aceite vegetal (método Rancimat®)	167
5.6.2.	Método FRAP (Ferric Reducing/antioxidant power)	174
5.6.3.	Método ABTS	179
5.6.4.	Método ORAC (Oxygen Radical Scavenging Capacity)	183
5.7.	<i>Evaluación de la actividad antioxidante de los derivados de hidroxitirosol en glóbulos rojos</i>	187
5.7.1.	Evaluación de la lipoperoxidación lipídica de la membrana de los glóbulos rojos	188
5.7.2.	Hemólisis oxidativa	190
5.7.3.	Evaluación de la citotoxicidad mediante la técnica MTT	192
6.	<b>Conclusions</b>	197
7.	<b>Bibliografía</b>	203



## *ABREVIATURAS*



## **A**

**AAL:** forma aldehídica del aglucón del ligustrósido.

**AAO:** forma aldehídica del aglucón de la oleuropeína.

**AAPH:** dihidrocloruro de 2,2'-azo-bis-(2-metilpropionamida).

**ABTS:** ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**AOM:** Active Oxygen Method.

**AOV:** aceite de oliva virgen.

## **B**

**BHA:** butilhidroxianisol.

**BHT:** butilhidroxitolueno.

## **C**

**CAT:** Conjugated Autoxidizable Triene.

**CCF:** cromatografía en capa fina.

**Cl<sub>3</sub>CD:** cloroformo deuterado.

## **D**

**DAOD:** forma dialdehídica del aglucón de la oleuropeína.

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

**DMSO:** dimetilsulfóxido.

**DMSO-d<sub>6</sub>:** dimetilsulfóxido hexadeuterado.

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazina.

## **E**

**EFSA:** European Food Safety Authority.

**EM:** espectrometría de masas.

## **F**

**FID:** Detector de ionización de llama.

**FRAP:** Ferric Reducing Antioxidant Power.

## **H**

**HMV:** alcohol homovanílico.

**HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia.

**HTy:** hidroxitirosol.

## **I**

**IR:** infrarrojo.

## **L**

**LDL:** lipoproteínas de baja densidad.



## *M*

**MDA:** malondialdehído.

**MTT:** bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolina.

## *O*

**ORAC:** Oxygen Radical Absorbance Capacity.

## *P*

**PBS:** tampón fosfato salino.

**PI:** período de inducción.

## *R*

**RMCD:**  $\beta$ -ciclodextrina.

**RMN:** resonancia magnética nuclear.

## *S*

**SDS:** dodecilsulfato sódico.

**SEM:** error estándar de la media.

## *T*

**TBA:** ácido tiobarbitúrico.

**TBARS:** especies reactivas a ácido tiobarbitúrico.

**TCA:** ácido tricloroacético.

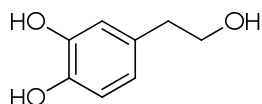
**Ty:** tirosol.

## ***1. INTRODUCCIÓN***

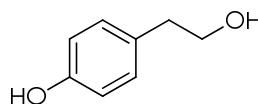


## 1. INTRODUCCION

La dieta mediterránea es objeto de numerosos estudios en cuanto a los efectos beneficiosos que produce en el organismo, principalmente por su incidencia positiva en la prevención de los accidentes cardiovasculares. El éxito de esta dieta es atribuido principalmente a su componente graso mayoritario, el aceite de oliva virgen (AOV). Su importancia radica en su alto contenido en ácido oleico y en compuestos fenólicos. Estos últimos destacan por su elevada actividad antioxidante, sobre todo los *orto*- y *para*-catecoles. El hidroxitirosol (2-(3'-4'-dihidroxifenil)etanol, **1**) y el tirosol (2-(4'-hidroxifenil)etanol, **2**) son dos de estos biofenoles y se encuentran en diversas fuentes naturales, siendo especialmente importante su presencia en el olivo, ya sea libre o en forma de glucósidos denominados oleuropeína y ligustrósido respectivamente, principales compuestos fenólicos presentes en la aceituna<sup>1</sup>.



**(1)** Hidroxitirosol (HTy)



**(2)** Tirosol (Ty)

Durante el proceso de extracción del AOV, la mayor parte de los biofenoles indicados se quedan en la fase acuosa o alpechín debido a su carácter hidrosoluble<sup>2</sup>. De hecho, en la producción del AOV el 80% del total de la aceituna que se moltura, es desechado<sup>3</sup> en forma de residuo. En este sentido, se producen unos 10 millones de toneladas al año de desechos sólidos o semisólidos a nivel mundial derivados de la industria olivarera. El almacenamiento o reciclaje de estos desechos supone un grave problema medio ambiental debido a su alto contenido de materia orgánica<sup>4</sup>. No obstante, una pequeña fracción de derivados secoiridoideos tanto de hidroxitirosol como de tirosol pasa al aceite, lo cual es suficiente para proteger al AOV de la oxidación y el enranciamiento que sufre durante el tiempo de su vida útil<sup>5</sup>.

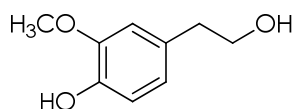
Estos derivados secoiridoideos de hidroxitirosol presentes en el aceite de oliva virgen muestran una actividad antioxidante similar a la del propio hidroxitirosol<sup>6</sup> y poseen una mayor lipofilia; no obstante, presentan un intenso sabor amargo<sup>7</sup> el cual comunican al aceite, y su aislamiento a partir del propio aceite es muy difícil, por lo que su uso como aditivo alimentario queda descartado.

Por ello, el hidroxitirosol se ha convertido en objeto de numerosos estudios por parte de diferentes grupos de investigación de todo el mundo. Presenta una capacidad protectora frente a la oxidación mucho mayor que los aditivos antioxidantes habitualmente utilizados por la industria alimentaria, fundamentalmente tocoferoles y BHT<sup>6</sup>. Sin embargo su carácter prácticamente insoluble en medio lipofílico hace que no pueda ser usado en este tipo de alimentos.

Además de poseer propiedades antioxidantes, se ha demostrado que el hidroxitirosol presenta actividad antimicrobiana, antihipertensiva, hipoglucémica, antiagregante plaquetaria, cardioprotectora y antiinflamatoria<sup>8-12</sup>, además de inhibir la proliferación y promover la apoptosis en numerosas líneas celulares tumorales humanas<sup>13</sup>. Recientemente se ha puesto de manifiesto mediante técnicas de acoplamiento (docking) que la presencia de un resto lipofílico es necesaria para una buena actividad anticancerosa en diversos *orto*-catecoles estudiados<sup>14</sup>.

Por otro lado, a pesar del hecho que el tirosol presenta una significativa disminución de la actividad antioxidante respecto al hidroxitirosol<sup>15</sup>, fundamentalmente debido a la ausencia del grupo *orto*-difenólico en su estructura química, se ha demostrado que ejerce un efecto protector frente al daño oxidativo en modelos celulares<sup>16</sup> y que mejora los sistemas defensivos intacelulares frente la oxidación<sup>17</sup>.

Las propiedades biológicas de estos compuestos *in vivo*, dependen de su absorción y posterior metabolismo. En este sentido, numerosos estudios en líneas celulares<sup>18-21</sup> han demostrado que los principales fenoles del aceite de oliva virgen, derivados de hidroxitirosol y tirosol, son rápidamente absorbidos y metabolizados apareciendo en fluidos biológicos fundamentalmente en forma de *O*-glucuronidados y sulfatados conjugados de hidroxitirosol y tirosol, junto con *O*-meticonjugados de hidroxitirosol (alcohol homovanílico, **3**).



**(3)** Alcohol Homovanílico (HMA)

Por todo ello y teniendo en cuenta el elevado interés en el uso de fitoquímicos como ingredientes biológicos para alimentos funcionales con valor nutricional añadido, el hidroxitirosol ya ha sido utilizado como ingrediente bioactivo en alimentos como zumo de tomate<sup>22</sup>, pan<sup>23</sup> o salchichas<sup>24</sup> con buenos resultados.

En los últimos años se han identificado en el aceite de oliva virgen otros componentes menores derivados de hidroxitirosol con estructura de éster<sup>25, 26</sup> o de isocromano<sup>27</sup>. Tales hallazgos han promovido la investigación sobre la preparación de nuevos derivados de hidroxitirosol que presenten un balance hidrófilo/lipófilo mejorado para su posible utilización como antioxidantes por parte de la industria alimentaria.

En este contexto, nuestro grupo de investigación inició hace algunos años una serie de colaboraciones, que se mantienen en la actualidad, con el Instituto de la Grasa (CSIC), el Departamento de Farmacología y Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga, el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición de Madrid (ICTAN, CSIC) y el centro Venta del Llano (Mengíbar, Jaén) del Instituto de Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) de la Junta de Andalucía, para el estudio y aprovechamiento de la fracción fenólica del aceite de oliva. Estas

colaboraciones están enmarcadas en tres proyectos de investigación<sup>28-30</sup> y han dado lugar a la publicación de numerosos artículos<sup>2,14,31-42</sup> y comunicaciones a congresos<sup>43-56</sup>, así como a la presentación de dos patentes internacionales<sup>57, 58</sup>.

En la presente Memoria, se describe la síntesis de nuevos derivados alquílicos de compuestos fenólicos presentes en el olivo que podrían mejorar la biodisponibilidad a nivel celular, así como la evaluación de su actividad antioxidante. Estos compuestos deben presentar, *a priori*, una actividad antioxidante similar a la de sus precursores libres, mayor estabilidad química que los ésteres antes mencionados, así como una buena liposolubilidad de manera que, tomando estas características en conjunto, hagan de este nuevo tipo de compuestos unos buenos candidatos como componentes funcionales de alimentos.

Además se presenta la síntesis de otra serie de compuestos en los que la unidad *orto*-difenólica está protegida por un grupo metilidendioxi.

Finalmente, se describe igualmente una nueva vía para la obtención de hidroxitirosol libre, así como la preparación de varias formas ortogonalmente protegidas de este biofenol.

## **2. ANTECEDENTES**





## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. La oxidación y los antioxidantes

Los procesos de oxidación se producen tanto en los alimentos como en los seres vivos. En el caso de los alimentos la oxidación deriva, por lo general, en una pérdida de la calidad comercial, organoléptica y sanitaria del producto<sup>59</sup>. En los organismos vivos la oxidación está relacionada con la producción de energía, asociada a la degradación de principios inmediatos (glúcidos, lípidos y prótidos) y con la respuesta inmune, a través de algunos de los radicales libres generados<sup>60</sup>, entendiendo por **radical libre** cualquier especie química que posea uno o más electrones desapareados en sus orbitales y sea capaz de tener existencia propia<sup>61</sup>.

Los radicales libres se generan en el organismo como resultado del metabolismo intracelular normal, fundamentalmente en las mitocondrias, a través de la fosforilación oxidativa que tiene lugar en la cadena respiratoria, y en los peroxisomas, orgánulos en cuyo interior hay gran variedad de enzimas que generan peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como consecuencia de su mecanismo catalítico. Adicionalmente existen diversos agentes externos que pueden favorecer la aparición de los mismos, como son: la radiación ultravioleta, la radiación gamma, el tabaco y diversos contaminantes medioambientales. En general, estos radicales libres no entrañan un desgaste importante, gracias a la acción protectora de sustancias o sistemas antioxidantes que permiten en cierta medida mantener un equilibrio fisiológico. La ruptura de este equilibrio provoca un **estrés oxidativo**, dando lugar a un aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes, que termina por alterar la función normal de la célula<sup>62</sup>.

La situación real en el organismo no es de un equilibrio estático, sino que es altamente dinámica de manera que los agentes oxidantes se están

produciendo continuamente y, asociados a éstos, se encuentran los antioxidantes<sup>63</sup>.

Así, el daño oxidativo sobre los lípidos en los vasos sanguíneos contribuye significativamente al desarrollo de la aterosclerosis, con los consiguientes problemas cardiocirculatorios. El daño sobre el ADN probablemente contribuye al desarrollo del cáncer y el estrés oxidativo sobre proteínas participa en el daño tisular asociado a enfermedades como la artritis reumatoide, las cataratas o el parkinson. De todos estos procesos es la peroxidación lipídica el más frecuente en nuestro organismo<sup>62</sup>, dando lugar a la alteración de la fluidez y permeabilidad de las membranas biológicas así como a la alteración de las proteínas, las enzimas, los receptores o canales iónicos asociados a ellas comprometiendo de esta manera la estructura y función celular.

En la **peroxidación lipídica**, y en las reacciones radicalarias en general, se produce una reacción en cadena que consta de varias etapas:

*a) Fase de inicio:* Es la primera reacción del proceso y, en ella, se generan los primeros radicales libres a partir de moléculas estables. Con la mediación de un agente iniciador (metales, radiaciones,...) se produce la ruptura homolítica de un enlace con formación de radicales libres. Así, la peroxidación lipídica se desencadena cuando el residuo de un ácido graso poliinsaturado es atacado por una especie reactiva de oxígeno que es capaz de abstraer un átomo de hidrógeno, en el carbono adyacente a un doble enlace (posición alílica) con formación de un radical alilo ( $L^{\bullet}$ ).



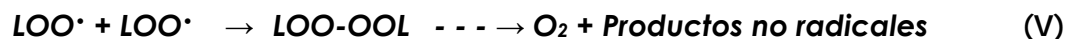
*b) Fase de propagación:* El radical alilo ( $L^{\bullet}$ ) reacciona con oxígeno para formar un radical peroxilo ( $LOO^{\bullet}$ ), y éste a su vez puede reaccionar con un lípido insaturado para formar un hidroperóxido ( $LOOH$ ) y un nuevo radical libre ( $L^{\bullet}$ ). Este último puede reaccionar con oxígeno para formar un radical peroxilo

y así sucesivamente. Por lo tanto, la autooxidación es un proceso en cadena de radicales libres.

La duración de esta fase lipoperoxidativa depende de varios factores como la relación de las proteínas y los lípidos en la membrana, la estructura del ácido graso, la concentración de oxígeno y la presencia o no de antioxidantes.



c) Fase de terminación: La velocidad de la reacción en cadena disminuye tras alcanzar un máximo. Los radicales reaccionan entre sí eliminándose y dando lugar a la formación de productos no radicales de estabilidad muy variada, entre los que se encuentran:



Otro mecanismo de terminación es la ciclación, proceso por el cual las moléculas de oxígeno quedan englobadas dentro de la cadena poliinsaturada. Sin embargo estas terminaciones son muy poco estables.

En el proceso de autooxidación lipídica se denomina período de inducción (P.I.) al tiempo durante el cual hay una formación de peróxidos escasa o indetectable, hasta el momento en el que se produce un incremento brusco en la oxidación. Como consecuencia de las reacciones de terminación aparecen productos oxidados estables, generalmente volátiles originados por rotura de las cadenas acílicas. Igualmente, durante el P.I. el consumo de oxígeno es muy lento, y aumenta bruscamente cuando tiene lugar la formación de los compuestos de terminación<sup>64</sup>.

Alternativamente, cuando el radical peroxilo ( $\text{LOO}^\bullet$ ) encuentra a un **antioxidante** (AH) capaz de donar un átomo de hidrógeno se forma de nuevo el correspondiente peróxido neutro ( $\text{LOOH}$ ), terminando así la cadena de reacciones. El  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y la ubiquinona (Coenzima  $\text{Q}_{10}$ ) son los antioxidantes más relevantes para participar en la fase de terminación de la cadena de reacciones de oxidación de los lípidos en los sistemas biológicos.



Posteriormente tiene lugar una estabilización de los radicales ( $\text{A}^\bullet$ ) por generación de productos estables<sup>65</sup>.



Un antioxidante se puede definir por tanto, como aquella sustancia que, cuando está presente en concentraciones menores en relación al sustrato oxidable, retrasa, evita o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato. Las características de un buen antioxidante son: a) la presencia de sustituyentes donadores de electrones o de hidrógeno al radical, en función de su potencial de reducción, b) la capacidad de deslocalización del radical formado en su estructura, c) la capacidad de quelación de metales de transición implicados en el proceso de oxidación y d) la accesibilidad al lugar de acción, dependiendo de su balance lipófilo-hidrófilo y coeficiente de reparto<sup>66</sup>.

Frente al daño oxidativo, el organismo posee un sofisticado sistema **antioxidante endógeno**, compuesto principalmente por enzimas celulares, entre las que se encuentran: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa. Además, **los antioxidantes exógenos** que recibe a través de la dieta refuerzan este sistema. Entre éstos cabe destacar: el ácido

ascórbico (vitamina C), los tocoferoles (vitamina E), los carotenoides y los compuestos fenólicos (tabla 1).

**Tabla 1.** Algunos agentes oxidantes, prooxidantes y antioxidantes endógenos y exógenos.

<b>Oxidantes</b>	<b>Prooxidantes</b>	<b>Antioxidantes</b>
Peroxinitrilo	Radical superóxido	<b>Enzimáticos</b>
Radical hidroxilo	Peróxido de hidrógeno	Superóxido dismutasa
Radical alquilo	Óxido nítrico	Catalasa
Radical peroxilo	Ubisemiquinona	Glutación peroxidasa
Radical alcoxilo		<b>No Enzimáticos</b>
Hidroperóxidos orgánicos		Polifenoles
Oxígeno singulete		$\alpha$ -tocoferol
		Ácido ascórbico

Estudios epidemiológicos<sup>67</sup> sugieren que estos antioxidantes naturales pueden tener un efecto beneficioso en muchas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, especialmente las enfermedades cardiovasculares, ya que contribuyen a disminuir el estrés oxidativo que conduce a la disfunción celular.

Por otra parte, la industria alimentaria emplea una amplia gama de aditivos antioxidantes para la elaboración y conservación de sus productos<sup>68</sup>, ya sean de origen natural o sintético, dependiendo de la naturaleza, más o menos lipídica, del producto que se pretende proteger frente a la oxidación.

Exceptuando los tocoferoles, la mayoría de estas sustancias naturales son hidrosolubles por lo que no se pueden utilizar como aditivos antioxidantes en los alimentos grasos. Por ello, la industria alimentaria emplea tocoferoles, algunos extractos fenólicos vegetales y productos de síntesis como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), ésteres del ácido gálico (de propilo, octilo y dodecilo) y palmitato de ascorbilo<sup>69</sup>. Los extractos vegetales tienen un uso limitado ya que se alcanzan bajas concentraciones en grasa y suelen conferir al alimento olores o sabores desagradables. Por otra parte, tanto BHA como BHT tienen baja capacidad antioxidante y han sido

cuestionados por mostrar una cierta actividad citotóxica<sup>70-72</sup>; los galatos también parecen tener actividad citotóxica<sup>73</sup>.

Por todo lo anteriormente expuesto, la industria alimentaria está demandando antioxidantes potentes, insípidos, a ser posible de origen natural y que posean propiedades nutricionales, de forma que su adición al alimento, además de mejorar su conservación, le confiera características funcionales<sup>74,75</sup>.

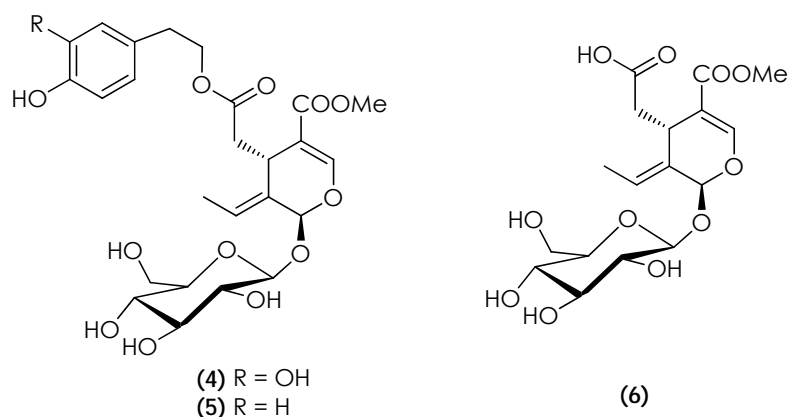
## 2.2. Los compuestos fenólicos del olivo y sus productos

**“Compuestos fenólicos”, “polifenoles” o “biofenoles”** son términos que se utilizan en la bibliografía<sup>76</sup> para definir aquellas sustancias que poseen un anillo de benceno con uno o más grupos hidroxilos y que pueden presentar otros grupos funcionales.

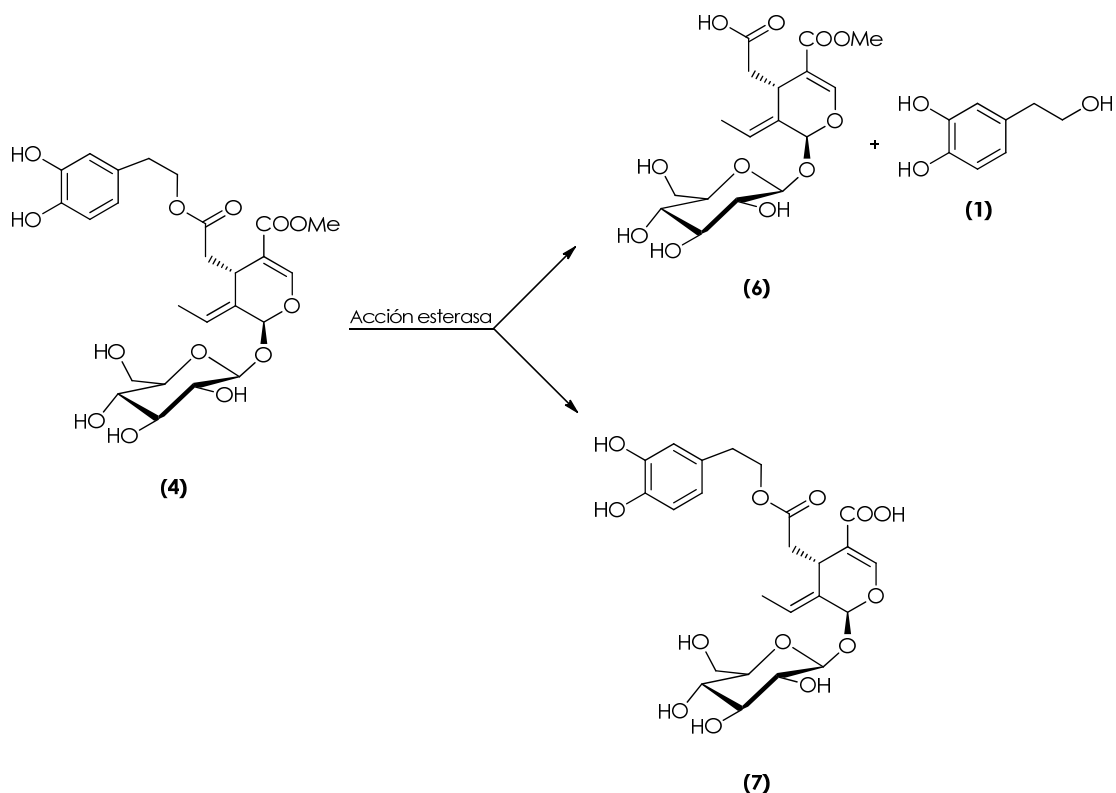
Los compuestos fenólicos son, como ya se ha indicado, importantes en los sistemas biológicos y, en particular, en el reino vegetal, presentando una gran variedad de estructuras y funciones. Están presentes principalmente en los frutos pero también en menor cantidad en hojas, flores y otros órganos vegetales.

Este apartado se va a centrar en el estudio en los compuestos fenólicos presentes en el olivo. Sin embargo existen otras fuentes importantes de este tipo de compuestos como son el té, el cacao, la granada o la uva.

Los principales compuestos fenólicos presentes en la **aceituna** son la oleuropeína (**4**) y el ligustrósido (**5**), que se forman por la esterificación de 2-(3',4'-dihidroxifenil)etanol (hidroxitiroso, HTy, **1**) y 2-(4'-hidroxifenil)etanol (tiroso, Ty, **2**), respectivamente, con el glucósido del ácido elenólico (**6**)<sup>77</sup>.



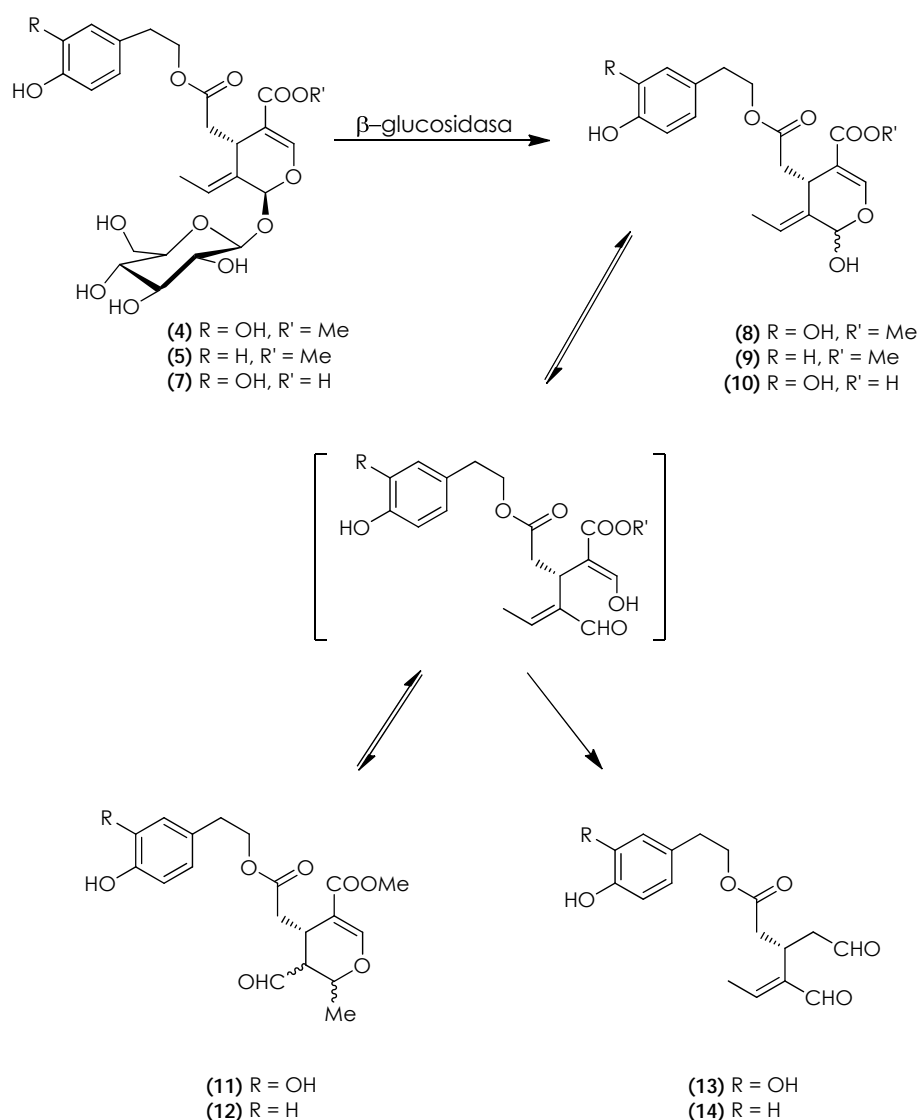
Las aceitunas verdes contienen una gran proporción de compuestos fenólicos, y para el caso particular de la oleuropeína (4), su contenido puede alcanzar hasta el 14% de la materia seca<sup>78</sup>. Por otra parte, el glucósido del ácido elenólico (6) y la desmetiloleuropeína (7) se forman por degradación de la oleuropeína (4) y van aumentando a lo largo de la maduración, en la medida que aumenta la actividad esterasa, atribuyéndose a esta enzima la formación de estos dos compuestos<sup>78</sup> (esquema 1).



Esquema 1. Formación del glucósido del ácido elenólico (6), hidroxitiroso (1) y la desmetiloleuropeína (7) por degradación de la oleuropeína.



Otro proceso enzimático importante que se produce durante la maduración de la aceituna es la hidrólisis del enlace glucosídico presente en la oleuropeína (**4**) y el ligustrósido (**5**), por acción de  $\beta$ -glucosidasas presentes en el fruto. El aglucón que resulta en cada caso (**8**, **9**) sufre transformaciones posteriores y, mediante equilibrios tautoméricos ceto-enólicos que implican la apertura del anillo heterocíclico<sup>79</sup> origina diversos estereoisómeros que se denominan en conjunto forma aldehídica del aglucón de la oleuropeína (AAO, **11**) y del ligustrósido (AAL, **12**), respectivamente (esquema 2).



**Esquema 2.** Formación de derivados secoiridoideos del hidroxitirosol y tirosol.

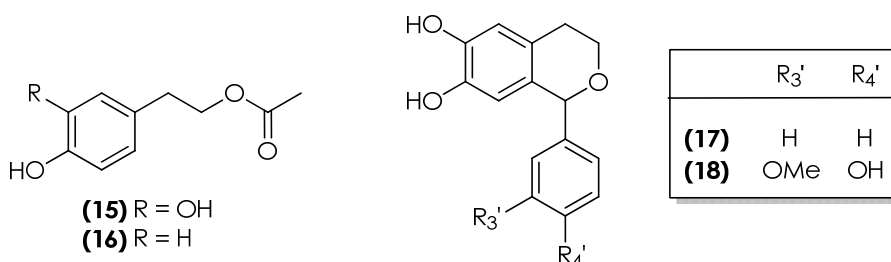
En un proceso similar, a partir de la desmetiloleuropeína (**7**) se obtiene el aglucón (**10**) que se descarboxila e isomeriza a la estructura dialdehídica (**13**),

que se denomina forma dialdehídica del aglucón de la oleuropeína descarboximetilada (DAOD) (esquema 2). De la misma manera que se obtiene esta forma dialdehídica, se obtiene la correspondiente forma dialdehídica procedente del desmetil ligustrósido, denominada oleocantal (**14**).

El **aceite de oliva virgen** (AOV) es un alimento tradicional, obtenido por presión en frío de las aceitunas, que está constituido principalmente por triglicéridos ( $\geq 98\%$ ) y mezclas complejas de componentes menores ( $\sim 2\%$ ) de naturaleza química muy diversa. Históricamente, la calidad nutricional atribuida al aceite de oliva virgen se debía a su alto contenido en ácido oleico. Sin embargo, actualmente la presencia de ácido oleico en elevada concentración no es exclusiva del AOV ya que nuevas variedades de aceite de girasol y de colza presentan una composición en ácidos grasos similar a la del aceite de oliva. No obstante, el AOV debe ser considerado un producto exclusivo gracias a sus componentes minoritarios, entre los cuales se encuentran los compuestos fenólicos. Tanto los componentes mayores como menores muestran una composición cualitativa y cuantitativa muy variable, dependiendo de la variedad de aceituna, condiciones climáticas y agronómicas, calidad y estado de madurez del fruto o el sistema de extracción del aceite<sup>78, 80-85</sup>.

Durante el proceso de extracción del aceite, la oleuropeína (**4**) por su carácter hidrosoluble no se incorpora al mismo, permaneciendo en el alperujo. El propio hidroxitirosol que se produce por la hidrólisis del enlace éster en la oleuropeína o en sus productos de degradación, sólo se encuentra en cantidades mínimas en aceites recién obtenidos debido a su escasa solubilidad en el aceite<sup>5</sup>. Sin embargo la concentración de hidroxitirosol libre suele aumentar con el envejecimiento del aceite, como consecuencia de la hidrólisis de los derivados secoiridoideos. Así pues, entre los componentes mayoritarios de la fracción fenólica del AOV se encuentran los derivados secoiridoideos antes mencionados, **11-14**, alcanzando concentraciones entre 50 a 800 mg/Kg, lo que da idea de su mayor lipofilia.

En los últimos años se han identificado otros derivados de hidroxitirosol y tirosol en el aceite de oliva *virgen*<sup>2, 25, 26</sup>: el acetato de hidroxitirosilo (**15**) y de tirosilo (**16**) y los 1-aryl-6,7-dihidroxi-isocromanos<sup>27</sup> (**17**, **18**).



Cabe destacar que, además de todos estos derivados del hidroxitirosol y tirosol, se encuentran en el aceite de oliva *virgen* otros compuestos fenólicos en menor proporción, tales como los ácidos cinámico (**19**) y sus derivados: ácidos ferúlico (**20**), *p*-cumárico (**21**), *o*-cumárico (**22**), cafeico (**23**) y sinapínico (**24**); derivados del ácido benzoico: ácidos gálico (**25**), protocatéquico (**26**), *p*-hidroxibenzoico (**27**), vanílico (**28**), siríngico (**29**), 3,4,5-trimetoxibenzoico (**30**) y gentísico (**31**); derivados del ácido fenilacético: ácidos *p*-hidroxifenilacético (**32**) y homovanílico (**33**). También se han detectado flavonoides, fundamentalmente la apigenina (**34**) y luteolina (**35**) y, en menor proporción la apigenina-7-glucósido (**36**) y luteolina-7-glucósido (**37**), vanillina (**38**) y otros componentes polares de carácter no fenólico como los ácidos quínico (**39**) y shiquímico<sup>14, 86</sup> (**40**) (figura 1).

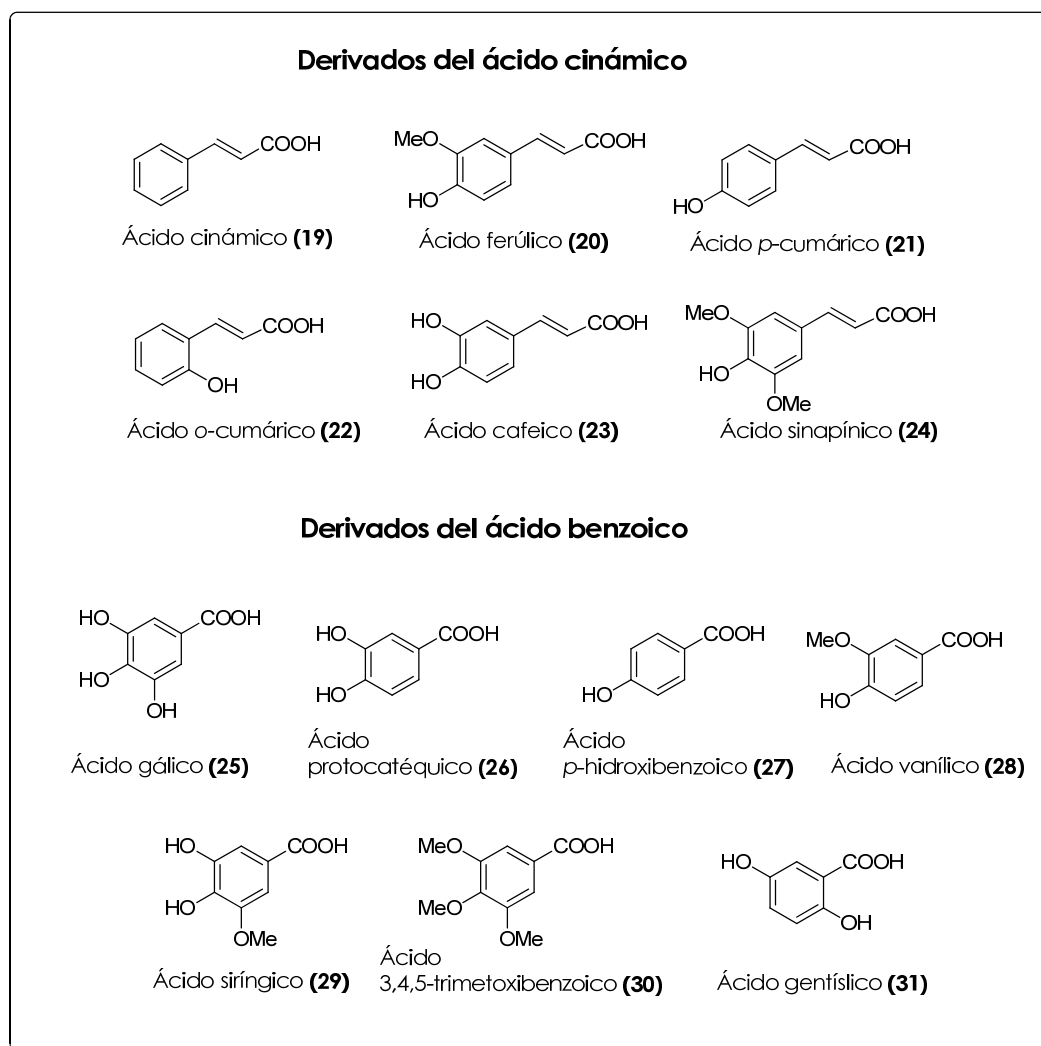
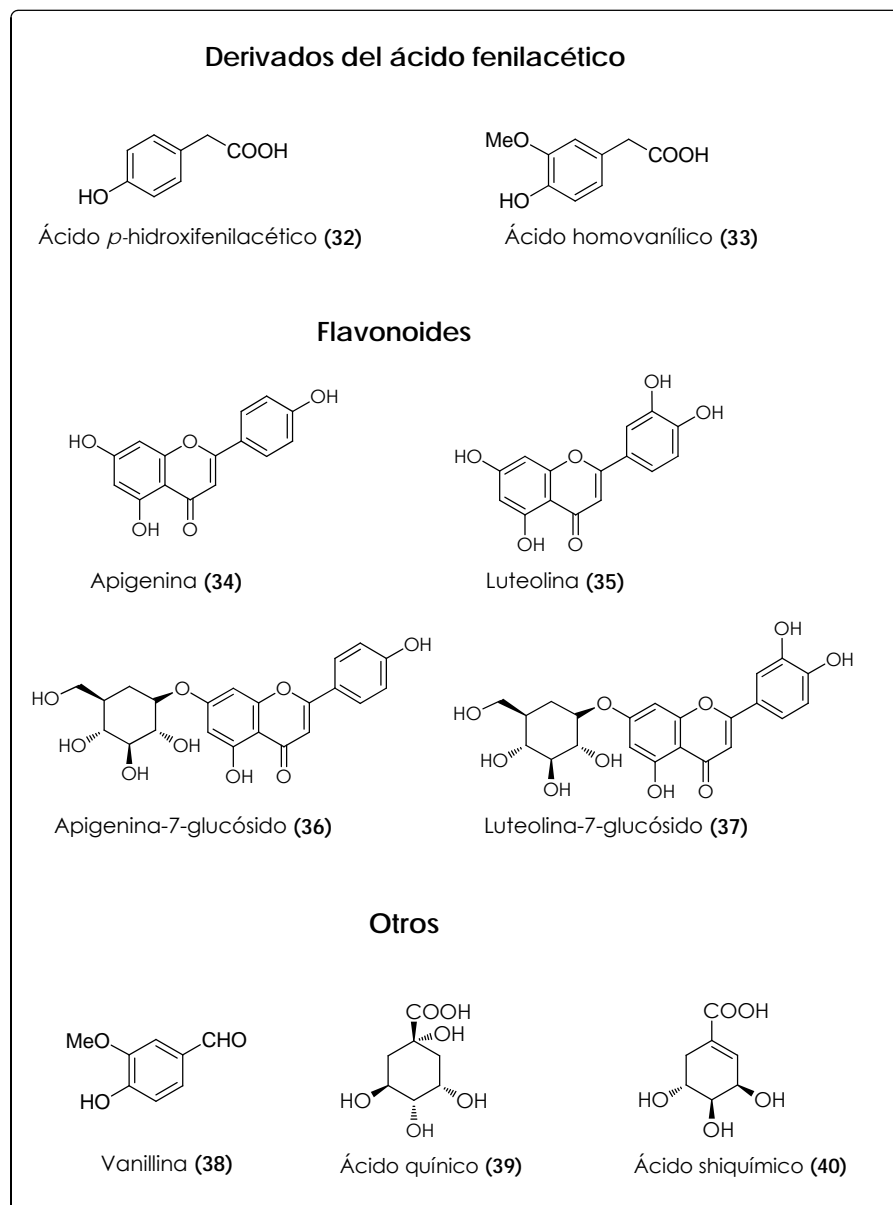


Figura 1. Estructuras de los compuestos fenólicos minoritarios presentes en el aceite de oliva.



**Figura 1 (continuación).** Estructuras de los compuestos fenólicos minoritarios presentes en el aceite de oliva.

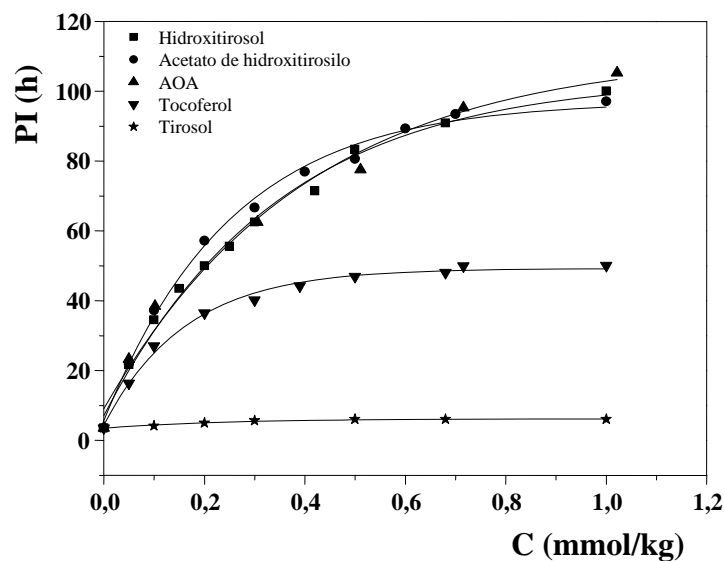
Al **alperujo** pasan la mayor parte de los compuestos fenólicos presentes en la aceituna, bien como glucósidos inalterados o bien como los productos de las hidrólisis enzimática y química que tienen lugar durante la maduración del fruto. La concentración de compuestos fenólicos en el alperujo varía entre 1,3 y 4,0% sobre residuo seco<sup>87</sup>, siendo los otros componentes sustancias minerales, azúcares, ácidos orgánicos no fenólicos, proteínas, lípidos, taninos y residuos sólidos en suspensión. Recientemente se ha puesto a punto un procedimiento, viable desde el punto de vista industrial, para aislar el

hidroxitirosol presente en el alperujo con un 96% de pureza<sup>88</sup> lo que permite obtener esta sustancia con un coste razonable.

### 2.3. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos del aceite de oliva

Diversos estudios han puesto de manifiesto que los polifenoles totales presentes en el AOV están directamente relacionados con la estabilidad oxidativa del mismo, tanto en recipientes abiertos a baja temperatura<sup>89, 90</sup> como a altas temperaturas (100-120° C) por los métodos de oxígeno activo (AOM) como el método Rancimat<sup>®</sup> <sup>91, 92</sup>, jugando un papel muy importante en la conservación de las características de calidad del aceite. Posteriormente este hecho ha sido corroborado al encontrarse una correlación aceptable con la estabilidad Rancimat a 100° C, corregida con un factor que tiene en cuenta la susceptibilidad oxidativa de la matriz según su composición en ácidos grasos<sup>93</sup>. Sin embargo como hemos visto anteriormente, la fracción fenólica es muy compleja y sus componentes mayoritarios tienen estructuras químicas diferentes, aunque la mayor parte de ellos contiene la unidad de hidroxitirosol o tirosol en sus moléculas.

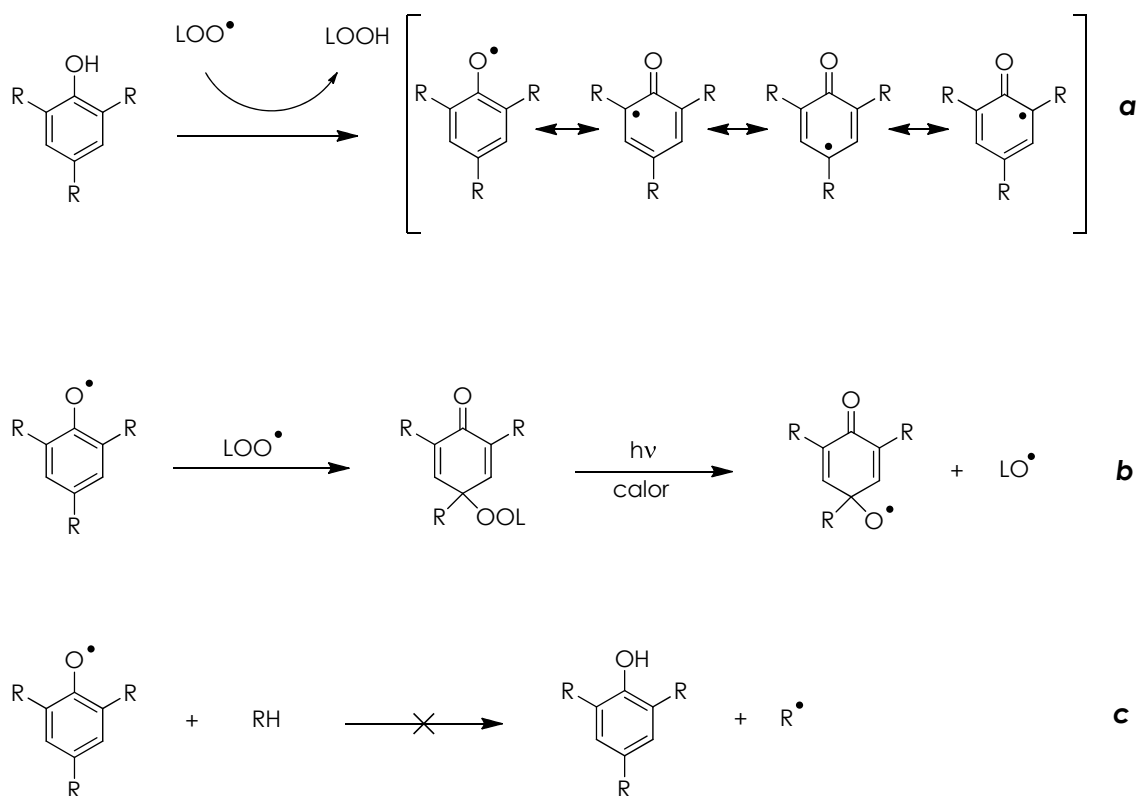
Mediante estudios de la estabilidad Rancimat de matrices lipídicas se ha demostrado fehacientemente que las capacidades antioxidantes del hidroxitirosol, la forma aldehídica del aglucón de la oleuropeína (**11**) y el acetato de hidroxitirosilo (**15**) son similares entre sí y mucho mayores que la del  $\alpha$ -tocoferol, mientras que el tirosol apenas muestra actividad<sup>15, 94, 95</sup> (figura 2).



**Figura 2.** Variación del periodo de inducción (PI) con la concentración de algunos de los antioxidantes naturales presentes en el aceite de oliva virgen<sup>14</sup>.

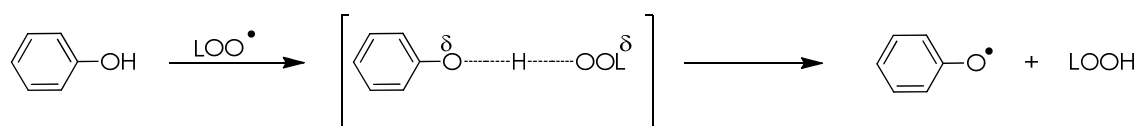
También se ha comprobado que en matrices lipídicas, el hidroxitirosol tiene mayor capacidad antioxidante que el ácido cafeico (**23**), el BHT y el BHA, aunque algo menor que la del galato de dodecilo<sup>96-98</sup>. Estos resultados confirman que la mayor actividad antioxidante la presentan los compuestos que contienen, al menos, una unidad *orto*-catecólica en la molécula<sup>6, 94</sup>.

Para explicar estos resultados se ha propuesto el mecanismo recogido en el esquema 3. El fenol transfiere un átomo de hidrógeno al radical peroxilo (3a). El radical fenoxilo formado a partir del antioxidante puede reaccionar con un segundo radical peroxilo mediante una asociación radical-radical, para dar un peróxido, la peroxidienona (3b). Los radicales fenoxilos son estables por resonancia, y relativamente poco reactivos frente a los ácidos grasos y el oxígeno, y por lo tanto no son capaces de iniciar o propagar reacciones de oxidación (3c). Sin embargo, la formación de peroxidienona puede limitar la eficacia de un antioxidante a temperatura elevada y en presencia de luz UV, ya que en estas condiciones se generan nuevos radicales libres (3b).



Esquema 3. Mecanismo de oxidación de los fenoles.

La eficacia de los antioxidantes fenólicos depende de la estabilización por resonancia del radical fenoxilo. Esta viene condicionada por los sustituyentes del anillo aromático y por el tamaño de los mismos<sup>99</sup>. Los grupos donadores de electrones reducen la energía del estado de transición en la formación del radical fenoxilo (esquema 4). Los sustituyentes voluminosos crean impedimento estérico y proporcionan una mayor estabilidad al radical fenoxilo. Sin embargo, el impedimento estérico también hace que el antioxidante sea menos accesible para el radical peroxilo.



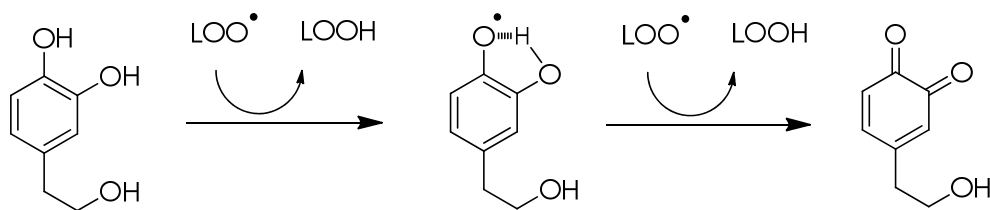
Esquema 4. Estado de transición para la formación del radical fenoxilo.

En el caso del tirosol, al carecer de grupos donadores de electrones, la energía del estado de transición es alta y la formación del radical fenoxilo es



reducida. En el BHT, la presencia del grupo alquilo terciario (*t*-butilo), reduce la energía del estado de transición, favoreciéndose la reacción con los radicales peroxílicos.

Para el hidroxitirosol y sus derivados se ha propuesto la formación de un radical muy estable por la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el hidrógeno libre del grupo oxidrilo y el radical fenoxilo<sup>100</sup>.



**Esquema 5.** Mecanismo antioxidante del hidroxitirosol por donación de hidrógeno.

Estudios realizados sobre flavonoides corroboran que la actividad antioxidante es mucho mayor para compuestos con varios sustituyentes hidroxilo, y en particular para las moléculas que tienen un grupo  $\alpha$ -difeno<sup>101, 102</sup>.

#### 2.4. Características nutricionales y farmacológicas de los polifenoles del AOV

Las propiedades beneficiosas para la salud del aceite de oliva se atribuyen al perfil único de la fracción fenólica, junto con la equilibrada composición en ácidos grasos<sup>103</sup>. Por este motivo se han estudiado las propiedades nutricionales y farmacológicas de los extractos fenólicos del olivo<sup>104-106</sup> y en particular del hidroxitirosol.

Los estudios realizados *in vitro* con hidroxitirosol indican que este compuesto actúa como un potente antioxidante<sup>107</sup> reduciendo la oxidación de LDL en plasma<sup>108</sup>. Además, inhibe o reduce las oxidaciones inducidas por diversos agentes, tales como el hierro en cultivo de hepatocitos<sup>109</sup>, peróxidos en la nitración de tirosina<sup>110</sup>, peróxidos en el ADN<sup>110, 111</sup>, el oxígeno activo en células Caco-2<sup>112</sup>, peróxidos en eritrocitos<sup>113</sup>, radicales peroxilo en la

membrana celular<sup>114</sup>, peróxidos en tejido hepático microsomal de ratas<sup>115</sup>, el radical NO• en muestras de aorta de ratas<sup>116</sup> o el *tert*-butilhidroperóxido en células hepáticas humanas<sup>117</sup>. Otros efectos son la inhibición de la activación endotelial<sup>118</sup>, de la actividad microsomal hepática en humanos<sup>119</sup>, y de la leucocito 5-lipooxigenasa sin inhibir la formación de tromboxano<sup>120</sup>. También se ha publicado que reduce la agregación plaquetaria inducida por colágeno que aumenta la deformabilidad de los hematíes<sup>121</sup> y que induce la apoptosis en células tumorales<sup>122, 123</sup>. Estudios recientes incluyen al hidroxitirosol y a su precursor, oleuropeína, en una clase de inhibidores de VIH-1 a nivel de fusión e integración<sup>124</sup>.

En experiencias **in vivo con ratas** se ha demostrado que no hay diferencias en la cantidad de compuestos eliminados en la orina entre dosis i.v. y oral en medio oleoso (99%), mientras que con dosis orales en medio acuoso sólo se elimina el 75%<sup>125</sup>. Los metabolitos renales son glucurónidos y sulfatos conjugados, ácidos homovanílico y 3',4'-dihidroxifenilacético, alcohol homovanílico y 3',4'-dihidroxifenilacetaldehído<sup>125</sup>.

En experiencias de administración de hidroxitirosol a **humanos** se han detectado 3-*O*-metil conjugados de dicho compuesto en el plasma<sup>126</sup>, siendo la cantidad absorbida dosis-dependiente de la ingestión<sup>127</sup>. Estos antecedentes han conducido a ensayar el uso del hidroxitirosol como **aditivo funcional** en zumo de tomate<sup>22</sup>, pan<sup>23</sup> o salchichas Frankfurt<sup>24</sup>.

Cabe destacar que, muy recientemente, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)<sup>128</sup> ha publicado una declaración de propiedades saludables de los polifenoles del olivo, en base a las numerosas investigaciones que existen sobre este tipo de compuestos, en la que concluye que existe una relación causa-efecto entre el consumo de dichos polifenoles (fundamentalmente hidroxitirosol, tirosol y sus derivados respectivos) y la protección de las LDL frente al daño oxidativo. Además, recomienda una ingesta diaria de 5mg de hidroxitirosol y sus derivados en aceite de oliva.

La fracción fenólica del aceite de oliva presenta un intenso sabor amargo<sup>7, 129, 130</sup>, debido a los derivados secoiridoideos del hidroxitirosol y tirosol. En cambio los fenoles libres y sus derivados simples son prácticamente insípidos.

Por otro lado, se ha demostrado que el tirosol, a pesar de presentar una menor actividad antioxidante que el hidroxitirosol (figura 2), manifiesta un efecto protector frente al daño oxidativo en modelos celulares<sup>16</sup>, además de mejorar los sistemas de defensa antioxidantes intracelulares<sup>17</sup>. Además, uno de los derivados secoiridoideos del tirosol denominado oleocantal (**14**), posee una actividad antiinflamatoria similar a la del ibuprofeno<sup>131</sup>. Recientes estudios han puesto de manifiesto que determinados monofenoles como el tirosol o el ácido *p*-cumárico así como compuestos *o*-difenílicos, inhiben la adhesión celular endotelial inducida por homocisteína independientemente de su actividad antioxidante, jugando un papel clave en el control de procesos asociados a inflamación<sup>132</sup>. Por último, otra evidencia que resalta la actividad biológica del tirosol es su capacidad para inducir proteínas relacionadas con la longevidad en ratas<sup>133</sup>.

## 2.5. Obtención de hidroxitirosol

### 2.5.1. Aislamiento a partir de residuos del olivar

Los residuos generados por la industria olivarera son una excepcional fuente de hidroxitirosol. Su aislamiento y posterior purificación a partir de estas fuentes han dado lugar a distintos estudios de bioactividad, biodisponibilidad, toxicología o de interacciones con ingredientes alimentarios.

Hasta la fecha se han descrito numerosos ensayos para la producción de hidroxitirosol de alto grado de pureza empleando para ello distintos procedimientos a partir de distintas fuentes como las hojas del olivo, las aguas de lavado de las aceitunas o el alperujo. Así, Nucci y *col.*<sup>134</sup> han sido capaces de producir grandes cantidades de hidroxitirosol de alta pureza mediante la

biotransformación de extractos de **hojas de olivo** por la acción de un enzima  $\beta$ -glucosidasa hipertermofílico inmovilizado en un soporte de quitosano, aprovechando así la capacidad de la quitina y el quitosano de adsorber moléculas polares como el hidroxitirosol. Otro procedimiento para la obtención de hidroxitirosol a partir de las hojas de olivo emplea dióxido de carbono supercrítico sobre el extracto crudo obtenido de la hoja<sup>135</sup>.

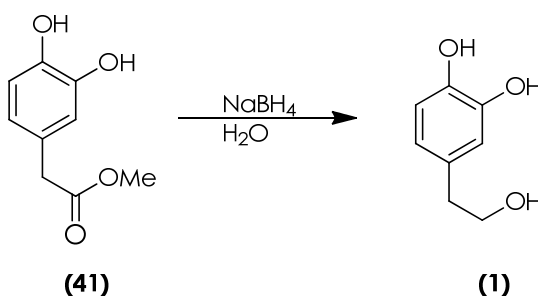
Por otro lado, también ha sido ampliamente estudiado el aislamiento y purificación de hidroxitirosol a partir de las **aguas de lavado** de las aceitunas, así como de las aguas residuales que se generan durante el procesado de las mismas. En este sentido, Brenes y *col.*<sup>136</sup> pusieron a punto un procedimiento protegido bajo patente por el que, tras una etapa de almacenamiento y fermentación, se lleva a cabo un proceso de extracción con ultrafiltración y adsorción en resinas no iónicas que da lugar a un extracto cuya concentración en hidroxitirosol está entre el 60 y 80%.

Fernández-Bolaños y *col.*<sup>88</sup> han desarrollado un sistema de aislamiento y purificación de hidroxitirosol a escala industrial a partir del **alperujo**, igualmente protegido bajo patente. En este caso la etapa clave del proceso es el empleo de una resina de intercambio iónico que es la encargada de atrapar los antioxidantes de la fracción acuosa, seguido de una elución con agua. A continuación se emplea otra resina, esta vez no iónica, que se lava con una mezcla de metanol/agua o etanol/agua. Una vez que se eliminan los disolventes se obtiene el hidroxitirosol en un 95% de pureza.

### **2.5.2. Síntesis de hidroxitirosol**

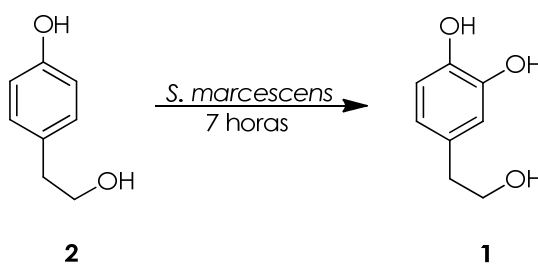
Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos en la mayoría de investigaciones que se están llevando a cabo en relación al hidroxitirosol y sus propiedades, parece razonable la búsqueda de nuevas formas para su obtención. Por ello, numerosos grupos han llevado a cabo distintos ensayos para su síntesis mediante procedimientos sencillos y que sean

económicamente ventajosos. Así, Bianco y *col.*<sup>137</sup> llevaron a cabo la síntesis de hidroxitirosol mediante la reducción con borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ) del 3,4-dihidroxifenilacetato de metilo (**41**) con un rendimiento del 80% (esquema 6).



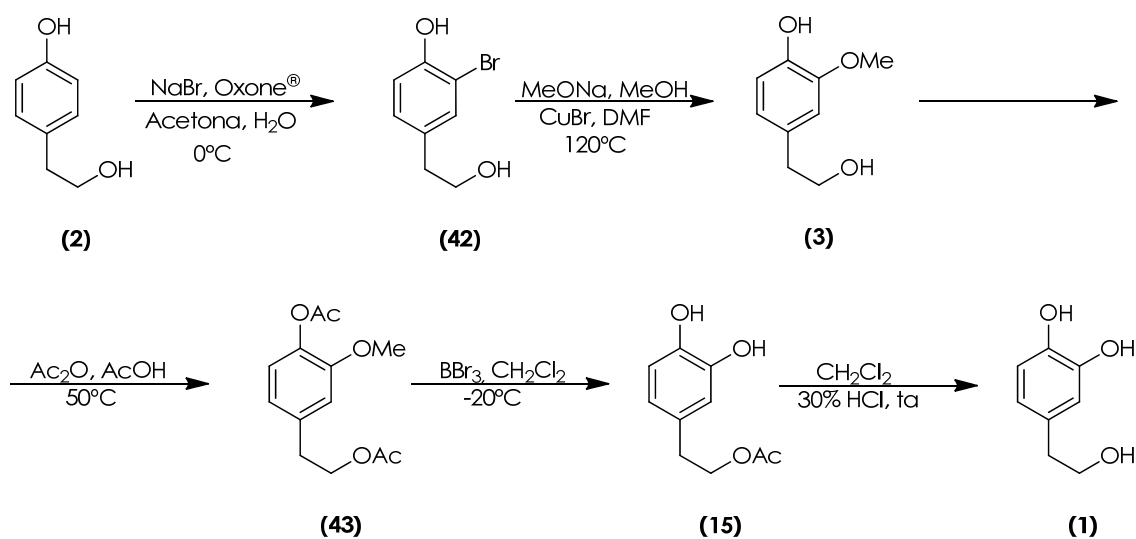
Esquema 6. Síntesis de hidroxitirosol por Bianco y *col.*<sup>136</sup>.

Espín y *col.*<sup>138</sup> por otra parte llevaron a cabo la biotransformación del tirosol en hidroxitirosol mediante una oxidación catalizada por una oxidasa que cataliza reacciones de hidroxilación de fenoles a *o*-difenoles y *o*-quinonas. De forma similar, Allouche y Sayadi<sup>139</sup> prepararon hidroxitirosol a partir de tirosol usando la especie bacteriana *Serratia marcescens*, con un rendimiento del 80% tras siete horas de incubación (esquema 7).



Esquema 7. Síntesis de hidroxitirosol por Allouche y Sayadi<sup>138</sup>.

Más recientemente Bovicelli y *col.*<sup>140</sup> han descrito la síntesis de hidroxitirosol a partir de tirosol siguiendo una ruta en varias etapas, todas ellas con excelentes rendimientos, tal y como se muestra en el esquema 8.



Esquema 8. Síntesis de hidroxitirosol por Bovicelli y *col.*<sup>140</sup>.

Además de los artículos mencionados, han surgido varias patentes en las que se describe la síntesis de hidroxitirosol. Así, Bernini y *col.*<sup>141</sup> sintetizan hidroxitirosol a través de una desmetilación oxidativa del alcohol homovanílico previa protección del alcohol primario presente en su estructura.

Finalmente, Álvarez de Manzaneda y *col.*<sup>142</sup> describen la síntesis de hidroxitirosol empleando como productos de partida 3,4-metilendioxi-bencenos.

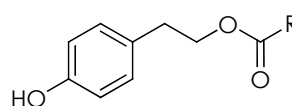
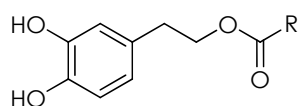
## 2.6. Derivados sintéticos del hidroxitirosol y tirosol

Como se ha visto hasta ahora, el hidroxitirosol es un excelente antioxidante con un gran atractivo industrial para su inclusión como componente funcional de alimentos. Sin embargo, presenta el inconveniente de su baja solubilidad en las grasas a las que debe proteger. Esta misma característica hace además que su biodisponibilidad sea escasa. Por ello, no es de extrañar que en los últimos años haya aumentado el interés en la obtención de derivados sintéticos que, manteniendo la actividad antioxidante original, posean características funcionales mejoradas, fundamentalmente el

aumento de la lipofilia, lo que permitiría aumentar la biodisponibilidad de este tipo de derivados. Por otro lado y como ya se ha mencionado anteriormente, a pesar de que el tirosol presenta una actividad antioxidante significativamente inferior a la del hidroxitirosol, recientes estudios ponen de manifiesto que el tirosol proporciona un potente efecto protector frente al daño oxidativo en sistemas celulares y mejora el sistema defensivo antioxidante intracelular<sup>16, 17</sup>.

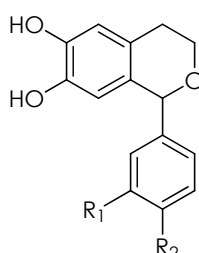
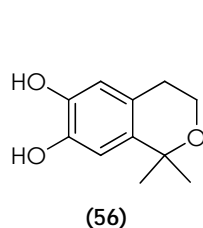
Por todo lo expuesto anteriormente, es razonable que los primeros derivados sintéticos preparados hayan resultado ser análogos a los encontrados de forma natural (véase apartado 2.2). De esta forma, se ha descrito la obtención del acetato de hidroxitirosilo **(15)**<sup>57, 95</sup> y otros ésteres derivados de hidroxitirosol de naturaleza lipofílica **(44-49)**<sup>30, 57, 143</sup>, así como la obtención del acetato de tirosilo **(16)** y otros ésteres derivados de tirosol **(50-55)**<sup>31</sup>.

También se ha descrito la síntesis de otros derivados con estructura de isocromano, igualmente con diversos sustituyentes que permiten modular su balance hidrófilo-lipófilo **(17, 18, 56-59)**<sup>144, 145</sup>.



- (15)** R = CH<sub>3</sub>, acetato de HTy  
**(44)** R = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, butirato de HTy  
**(45)** R = C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>, laurato de HTy  
**(46)** R = C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>, palmitato de HTy  
**(47)** R = C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>, estearato de HTy  
**(48)** R = C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>, oleato de HTy  
**(49)** R = C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>, linoleato de HTy

- (16)** R = CH<sub>3</sub>, acetato de Ty  
**(50)** R = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, butirato de Ty  
**(51)** R = C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>, laurato de Ty  
**(52)** R = C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>, palmitato de Ty  
**(53)** R = C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>, estearato de Ty  
**(54)** R = C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>, oleato de Ty  
**(55)** R = C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>, linoleato de Ty



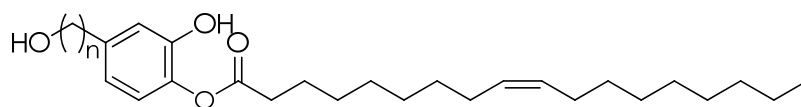
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>(17)</b>	H	H
<b>(18)</b>	H	OMe
<b>(57)</b>	OH	OH
<b>(58)</b>	OMe	OH
<b>(59)</b>	OC <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	OC <sub>8</sub> H <sub>17</sub>

Todos estos derivados sintéticos presentan una actividad antioxidante similar al propio fenol de partida libre<sup>30, 31, 145</sup> siendo algunos de ellos incluso más potentes que éste en determinadas condiciones<sup>146</sup>. Actualmente se están realizando diversos estudios de la actividad farmacológica de los mismos, habiéndose encontrado que tanto los ésteres<sup>143</sup> como los isocromanos<sup>147</sup> derivados de hidroxitirosol presentan actividad anticancerosa. Además, se ha demostrado que tanto el hidroxitirosol como su acetato ejercen un efecto neuroprotector en modelos de hipoxia-reoxigenación en ratas<sup>35</sup>, así como que ambos compuestos, cuando son administrados a ratas por vía oral, inhiben la agregación plaquetaria inhibiendo la síntesis de tromboxano y la producción de óxido nítrico<sup>36</sup>.

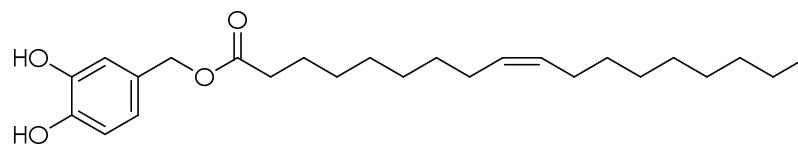
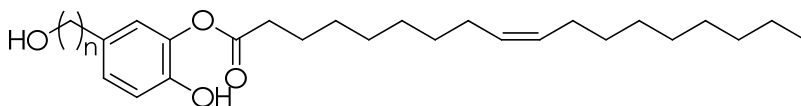
Recientemente se ha publicado la síntesis de otros derivados (**60-63**) de este tipo de compuestos en los que uno de los *OH* fenólicos es sustituido por un grupo éster de naturaleza lipofílica<sup>148</sup>, a diferencia de los primeros donde la modificación se produce en el alcohol primario de la cadena alquílica. La evaluación de la capacidad de captación de radicales libres para este tipo de compuestos (figura 3) en comparación con sus análogos con los dos *OH* fenólicos libres (**64, 65**), mostró que aquéllos en los que la modificación tuvo lugar en el *OH* fenólico poseen peor actividad que los que se modificaron en el alcohol primario. Esta diferencia se acentúa al evaluar la actividad antioxidante en una matriz lipídica mediante el ensayo Rancimat® (figura 4). Estos estudios ponen de manifiesto que la posición en la que se introduce el grupo acilo juega un papel determinante en la actividad antioxidante de este tipo de derivados.



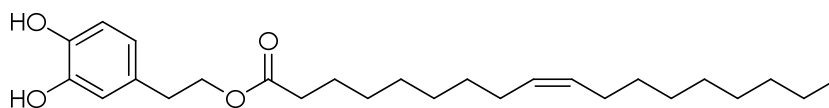
	n
(60)	1
(61)	2



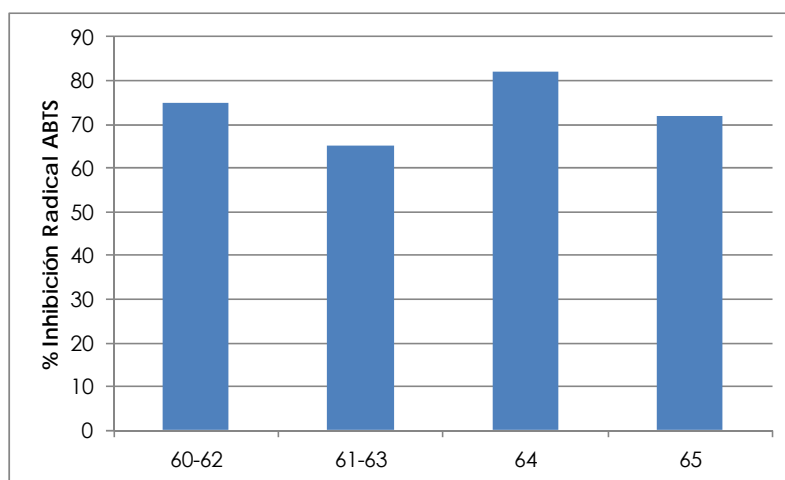
	n
(62)	1
(63)	2



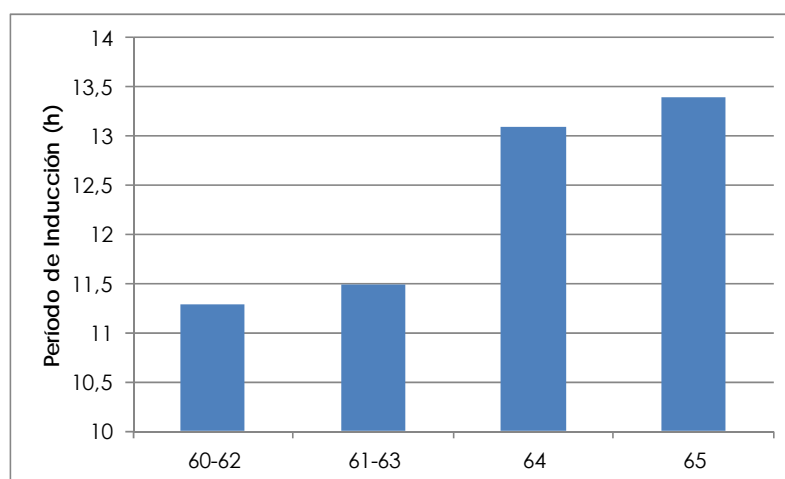
(64)



(65)

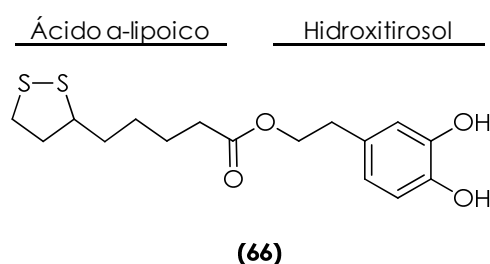


**Figura 3.** Capacidad de captación de radicales libres por el método ABTS para los compuestos **60-63** comparada con los compuestos **64** y **65**.

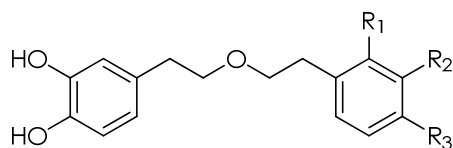


**Figura 4.** Períodos de inducción de los compuestos **60-63** comparado con los de los compuestos **64** y **65**.

Más recientemente se ha descrito la síntesis de un nuevo éster de hidroxitirosol derivado del ácido  $\alpha$ -lipoico<sup>149</sup>. El ácido  $\alpha$ -lipoico es un compuesto no fenólico presente en algunos alimentos como la patata, carne roja y trigo, además de ser un cofactor natural de numerosos complejos multienzimáticos que se encuentra tanto en organismos eucariotas como procariontes en los que juega un papel esencial en el metabolismo de éstos<sup>149</sup>. Este nuevo compuesto (**66**), derivado de dos sustancias con actividad biológica por separado, demostró poseer un efecto antiproliferativo sobre la línea celular HT-29 del adenocarcinoma colorectal humano mayor que sus precursores por separado.



Por último, indicar que el único antecedente relativo a los éteres de hidroxitirosilo aparece en un artículo publicado recientemente<sup>150</sup>, donde se describe la actividad antioxidante de diversos derivados de fenetilo, entre los que se encuentran los compuestos **67-69**. No obstante, la preparación de estos derivados no se describe en ese artículo estando protegida bajo patente<sup>151</sup>, tanto su síntesis como su aplicación en casos de nefritis.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>(67)</b>	OH	OH	H
<b>(68)</b>	OH	H	OH
<b>(68)</b>	H	OH	OH

## 2.7. Relación estructura/actividad de los antioxidantes fenólicos

La actividad antioxidante de los derivados fenólicos puede verse afectada, entre otros motivos, por diferencias en sus estructuras. A continuación se describen los diferentes aspectos estructurales que pueden influir en dicha actividad.

### 2.7.1. Influencia del número de hidroxilos fenólicos

La presencia de grupos hidroxilos fenólicos es la principal causa responsable de la actividad antioxidante y de captación de radicales libres en este tipo de compuestos. Los fenoles donan el átomo de hidrógeno del *OH* fenólico al radical libre, de forma que se detiene la fase de propagación del proceso de oxidación, ya visto en el apartado 2.1. Diversos estudios en los que se compara la captación de radicales libres de hidroxitiroso y tiroso<sup>152, 153</sup>, han mostrado que el hidroxitiroso posee una actividad mucho mayor que el tiroso. Se obtuvieron resultados similares al comparar los períodos de inducción (PI) mediante el ensayo Rancimat® en el que el hidroxitiroso mostró tiempos de inducción hasta cinco veces superiores que el tiroso<sup>15, 154</sup> (figura 2).

Comparaciones entre hidroxitiroso y los ácidos gálico (**25**) y protocatéuico (**26**) o sus alcoholes correspondientes, alcohol gálico (**70**) y alcohol protocatéuico (**71**)<sup>155, 156</sup>, muestran que la presencia de un tercer grupo hidroxilo en el anillo aromático aumenta la capacidad antioxidante, como se deduce de los ensayos de la capacidad de captación de radicales

libres y los tiempos de inducción en el ensayo Rancimat® mostrados en la figura 5.

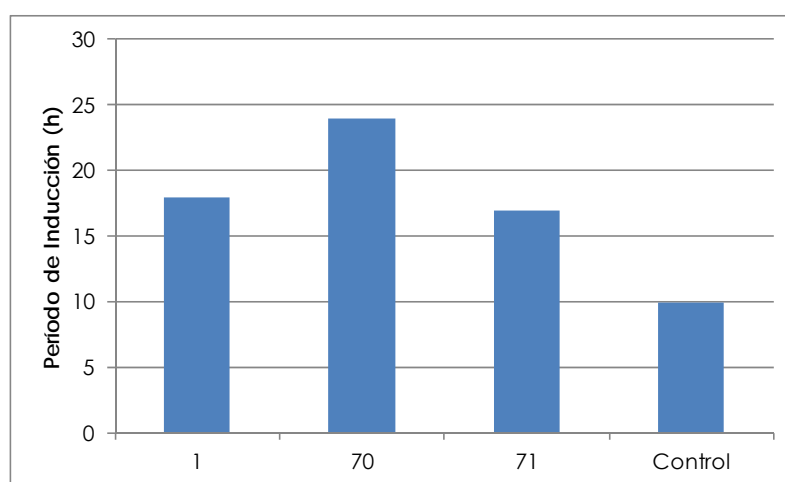
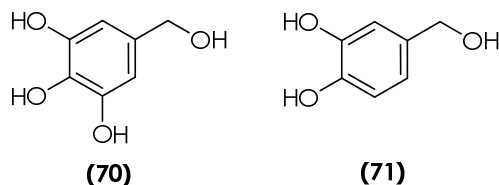
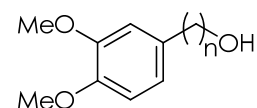
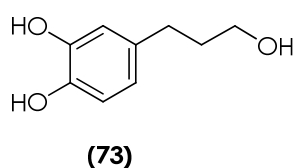
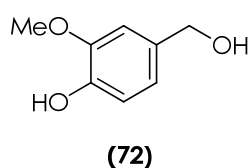


Figura 5. Períodos de Inducción obtenidos en el ensayo Rancimat para hidroxitirosol (1), alcohol gálico (70) y alcohol protocatéquico (71).

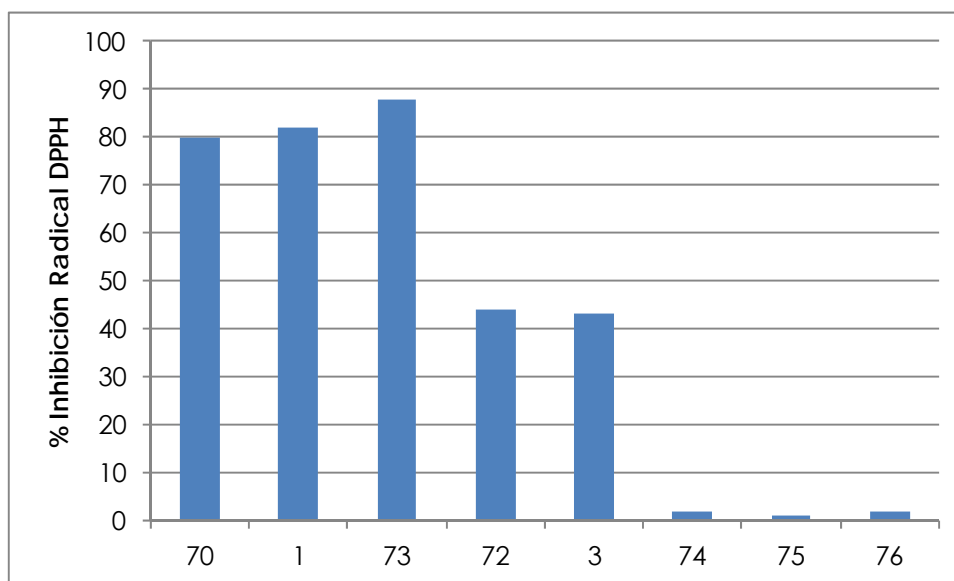
### 2.7.2. Influencia del número de grupos metoxilo (OCH<sub>3</sub>)

La presencia de grupos metoxilo como sustituyentes en anillos aromáticos de compuestos fenólicos naturales con capacidad antioxidante, es muy común. Así por ejemplo, los encontramos en alcoholes fenólicos como alcohol vanílico (72) o alcohol homovanílico (3) y ácidos fenólicos como ácido vanílico (28), ácido homovanílico (33), ácido siríntrico (29) o ácido ferúlico (20). Los primeros datos obtenidos mediante ensayos de captación de radicales libres para este tipo de compuestos<sup>157</sup>, han mostrado mejores resultados para el caso del ácido cafeico (23) en cuya estructura está presente la unidad *ortho*-catecólica, que para el caso del ácido ferúlico, en el cual un grupo metoxilo reemplaza a uno de los OH fenólicos. Además, mediante el método Rancimat®

se confirma esta tendencia ya que el ácido cafeico protege mucho mejor las matrices lipídicas que el ácido ferúlico con tiempos de inducción tres veces superiores<sup>154</sup>. Otro estudio comparativo entre alcoholes fenólicos en cuya estructura se encuentra la unidad *orto*-catecólica y alcoholes fenólicos que presentan uno o dos grupos metoxilos en lugar de los *OH* fenólicos<sup>156</sup>, muestra que la capacidad de captación de radicales libres es mayor en el caso de los compuestos con la unidad *orto*-catecólica intacta (figura 4). Este es el caso del alcohol protocatéquico (**71**), hidroxitirosol (**1**) y alcohol dihidrocafeico (**73**). Esta capacidad cae en el caso de los compuestos monofenólicos como el alcohol vanílico (**72**) o el homovanílico (**3**). Por último, aquellos compuestos con los dos *OH* metilados son los que presentan la menor capacidad de captación de radicales libres, como es el caso del alcohol verátrico (**74**), alcohol homoverátrico (**75**) o el 3-(3',4'-dimetoxifenil) propanol (**76**).



	n
<b>(74)</b>	1
<b>(75)</b>	2
<b>(76)</b>	3



**Figura 6.** Capacidad de captación de radicales libres por el método DPPH para hidroxitirosol (1), alcohol protocatéquico (71), alcohol dihidrocafeico (73), alcohol vanílico (72), alcohol homovanílico (3), alcohol verátrico (74), alcohol homoverátrico (75) y 3-(3',4'-dimetoxifenil)propanol (76).

### 2.7.3. Influencia de la longitud y naturaleza de la cadena alquílica

La longitud de la cadena alquílica que conecta el anillo aromático con el grupo carboxílico o alcohol juega un importante papel en la actividad de este tipo de compuestos, ayudando de alguna manera a la estabilización del radical formado durante el proceso de oxidación. En este sentido, recientemente se ha llevado a cabo un estudio en el cual se evaluaron los tiempos de inducción a diferentes concentraciones de los ácidos vanílico (28) y homovanílico (33) en aceite de oliva refinado<sup>154</sup>, encontrándose que el ácido homovanílico posee mejores PI que el ácido vanílico debido a la mayor longitud de la cadena alquílica. Un estudio más reciente<sup>156</sup>, en el cual se lleva a cabo la comparación de la capacidad de captación de radicales libres entre tres tipos de alcoholes fenólicos (alcohol protocatéquico (71), hidroxitirosol y alcohol dihidrocafeico (73)), ha puesto de manifiesto que un aumento en la longitud de la cadena alquílica produce un incremento de la capacidad antioxidante. Este hecho se corrobora en el ensayo Rancimat®, en el que se observa que los tiempos de inducción son mayores para aquellos compuestos con mayor longitud de cadena.



el medio<sup>166</sup>, así como por la naturaleza del sustrato lipídico, el pH, la temperatura y composición de las fases<sup>167, 168</sup>.

Sin embargo, diversos estudios han puesto de manifiesto algunas excepciones a esta teoría. Así, en una revisión reciente<sup>169</sup> se concluye que existe una clara relación entre la longitud de la cadena alquílica en ésteres derivados de compuestos fenólicos lipofílicos y la actividad antioxidante de los mismos. De esta forma, los derivados que presentan cadenas alquílicas de longitud intermedia son capaces de mejorar la eficacia de antioxidantes fenólicos en emulsión mejor que aquellos antioxidantes de cadena larga (tabla 2).

**Tabla 2.** Longitud de cadena alquílica óptima para derivados de compuestos fenólicos lipofílicos en emulsiones

<b>Antioxidante fenólico</b>	<b>Derivado con máxima eficacia</b>
Ácido clorogénico	C12 (dodecil éster)
Ácido rosmarínico	C8 (octil éster)
Hidroxitirosol	C12 (lauril éster)
Ácido dihidrocafeico	C8 (octil éster)
Rutina	C12 (lauril éster)

Por todo lo anteriormente expuesto, cuando se pretende evaluar la actividad antioxidante de cualquier sustancia, se hace necesario utilizar más de un método para comprobar la potencia antioxidante de la misma en diferentes condiciones.

Los distintos métodos de estudio de la actividad antioxidante se han clasificado de diferentes formas<sup>170-175</sup> empleándose algunos de ellos tanto en alimentos como en sistemas biológicos, por lo que a veces es difícil expresar en qué tipo de muestra son más adecuados. De forma general, se puede indicar que estos métodos han evolucionado desde los procedimientos químicos, utilizados inicialmente en alimentos, hacia los métodos *ex vivo* que emplean tejidos o fluidos biológicos<sup>176</sup>. Todos ellos tienen en común la presencia de un



agente oxidante, un sustrato adecuado y una estrategia de medida del punto final.

De manera general y basándose en la reacción química que tiene lugar, los principales métodos de medida de la capacidad antioxidante se pueden clasificar en dos categorías: los basadas en una reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) y los basadas en una reacción redox mediante la transferencia de un electrón del antioxidante (ET)<sup>170</sup>. Ambos mecanismos se dan siempre en paralelo donde la contribución de uno u otro va a depender de la naturaleza del disolvente y del potencial redox de las especies implicadas. Generalmente, en disolventes apolares el mecanismo HAT es el predominante, mientras que en disolventes polares como es el metanol o etanol, el mecanismo ET es el que prevalece. Tanto los métodos HAT como ET se proponen para medir la capacidad de secuestro de radicales, indicador de la capacidad potencial antioxidante de la muestra<sup>170</sup>.

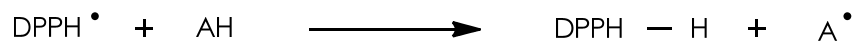
### **2.8.1. Métodos basados en el mecanismo ET**

Existen multitud de métodos basados en mecanismos de transferencia de electrones que miden la capacidad reductora de los antioxidantes. El agente oxidante cambia de color cuando se reduce al captar un electrón del antioxidante, y el cambio de color se correlaciona con la concentración del antioxidante. Entre ellos cabe destacar los métodos **FRAP** (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), **DPPH** (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y **ABTS** (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico).

En este mecanismo, el efecto del pH causa una influencia importante sobre la capacidad reductora de los antioxidantes, por lo tanto es un parámetro a controlar y tener en cuenta. En condiciones ácidas, como ocurre en el método FRAP, la capacidad reductora puede ser modificada debido a la protonación de los compuestos antioxidantes, mientras que en condiciones básicas la disociación del protón del compuesto fenólico mejora la capacidad reductora del antioxidante.



a su correspondiente hidracina<sup>183</sup> con la consiguiente disminución de absorbancia, que resulta ser inversamente proporcional a la concentración y al tiempo de reacción del antioxidante<sup>184, 185</sup> (esquema 10).



**Esquema 10.** Reducción del radical DPPH• en presencia de un antioxidante

La ventaja fundamental de este método radica en el uso de un radical estable y comercial. Asimismo, la alta reproducibilidad del método lo convierte en una alternativa ampliamente utilizada para la evaluación de la actividad antioxidante en alimentos.

### 2.8.1.3. Método ABTS

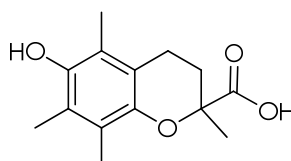
El **método ABTS** mide la capacidad de un compuesto oxidante para reducir el ión Fe<sup>3+</sup> (férrico) a Fe<sup>2+</sup> (ferroso) en un medio ácido. Se basa en la inhibición de la absorbancia a 730nm del radical catión ABTS<sup>•+</sup>, cromóforo verde-azulado que se reduce en presencia del antioxidante perdiendo color proporcionalmente<sup>182</sup>. Este método es aplicable al estudio de antioxidantes tanto lipofílicos como hidrofílicos, compuestos puros y extractos de alimentos. Su aplicación resulta sencilla al no necesitar altas temperaturas para la generación de los radicales y la actividad antioxidante puede ser evaluada en un amplio rango de pH<sup>186</sup>. Este método no es útil para aquellos antioxidantes que contengan grupos *SH* en sus estructuras, como el glutatión. Además se trata de un método simple y barato que últimamente ha encontrado aplicación en la determinación de la capacidad antioxidante en el plasma<sup>179,187</sup>.

### 2.8.2. Métodos basados en mecanismos HAT

Estos métodos se basan en una reacción química de competencia, donde un antioxidante y un sustrato compiten por los radicales peroxilo generados a través de la descomposición de azocompuestos. Por tanto, los métodos basados en mecanismos HAT cuantifican la capacidad donadora de átomos de hidrógeno por parte de los antioxidantes. Entre estos métodos se incluyen el **ORAC** (Oxygen Radical Absorbance Capacity), el **TRAP** (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter) y el **CAT** (Conjugated Autoxidizable Triene). Ambos se diferencian tanto en el tipo de sustrato utilizado como en las condiciones de reacción y en los métodos de cuantificación.

#### 2.8.2.1. Método TRAP

El **método TRAP**<sup>188</sup> ha sido el más usado durante los años 80 y 90. Usa radicales peroxilos generados por el AAPH (dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropilo)). Tras añadir el AAPH a la muestra, la oxidación de los materiales oxidables se registra por la medida del oxígeno consumido durante la reacción. Durante un período de inducción, esta oxidación es inhibida por los antioxidantes. La duración del período de inducción (fase de retraso) se compara con la de un patrón que es el TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, **78**) a una concentración conocida.



(78)

El principal problema de este método radica en la determinación del punto final, ya que el electrodo de oxígeno no mantiene su estabilidad durante todo el período de tiempo requerido. Por ello, ofrece un alto grado de imprecisión.

### 2.8.2.2. Método ORAC

El **método ORAC** se aplica para medir la capacidad antioxidante tanto en alimentos<sup>189</sup> como en muestras biológicas<sup>190</sup>. Inicialmente se puso a punto con  $\beta$ -ficoeritrina ( $\beta$ -PE) como sustancia fluorescente. Sin embargo, Ou y *col.*<sup>191</sup> encontraron que la  $\beta$ -PE presentaba algunos inconvenientes debido a la inestabilidad en las condiciones de trabajo al tratarse de una proteína fotoinestable y a su reacción con los polifenoles. Por este motivo se reemplazó la  $\beta$ -PE por fluoresceína, FL, sustancia sintética fluorescente cuyo producto de reacción está bien caracterizado<sup>168</sup>.

La prueba ORAC da una medida directa de la capacidad antioxidante frente a radicales peroxilo tanto de compuestos hidrofílicos como lipofílicos<sup>192</sup>. En general, la fluorescencia disminuye en presencia de un radical libre y se mantiene a lo largo del tiempo ante un antioxidante. La cuantificación del área neta bajo la curva obtenida del descenso de la intensidad de fluorescencia proporcionada por la fluoresceína en presencia de un antioxidante a lo largo del tiempo, se relaciona directamente con la capacidad antioxidante del compuesto a analizar. Por tanto, el descenso de fluorescencia va a depender de la concentración del radical libre, de la concentración del antioxidante y de su actividad.

La capacidad antioxidante total, medida como valor de ORAC, presenta una correlación significativa con el contenido fenólico total en té, frutas y suplementos antioxidantes de productos naturales con un coeficiente de correlación lineal superior a 0,85<sup>189</sup>.

Hay distintas formas de expresar los resultados en función del método utilizado. Una de ellas, ampliamente utilizada y aplicable a casi todos los métodos, tanto los basados en mecanismos HAT como ET, es el parámetro **TEAC** (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). Este parámetro fue introducido por primera vez con el método ABTS para representar la capacidad

antioxidante de diversas sustancias en comparación con un antioxidante estándar y estable, el Trolox (**80**), un análogo hidrosoluble de la vitamina E<sup>173</sup>.

### 2.8.2.3. Método CAT

El método **CAT** (Conjugated Autoxidizable Triene) es un novedoso método puesto a punto por Laguerre y *col.*<sup>193</sup>. Este ensayo se basa en propiedades espectrales de los triglicéridos (TAG) naturales presentes en el *aceite de tung*, que se obtiene de las semillas de *Aleurites fordii*, un árbol de pequeño tamaño de la familia de las euforbiáceas. Dichos triacilgliceroles contienen alrededor de un 86% de una mezcla isomérica de ácido oleosteárico, prácticamente compuesto en su totalidad por el  $\alpha$  isómero ( $\Delta^9c$ ,  $\Delta^{11t}$ ,  $\Delta^{13t}$ ) el cual es un ácido octadecatrienoico con un trieno conjugado que posee una alta sensibilidad oxidativa y una fuerte absorción en el ultravioleta a 273nm. Bajo condiciones de oxidación inducidas por un agente que genera radicales peroxilo [2,2'-azobis(2-amidinopropano), AAPH] a 37°C, la degradación de los trienos conjugados en emulsión en un buffer fosfato a pH 7,2, viene acompañada de una decoloración a 273 nm. La adición de compuestos fenólicos da lugar a un retraso del proceso de oxidación y permite la determinación espectrofotométrica de la capacidad antioxidante en comparación con Trolox.

### 2.8.3. Determinación de la oxidación lipídica

Por otro lado, los métodos de determinación de la oxidación lipídica han sido muy desarrollados. Los sustratos lipídicos utilizados incluyen diversos tipos de grasas y aceites, el ácido linoleico, los ésteres metílicos de ácidos grasos y las LDL<sup>174</sup>. La oxidación puede ser iniciada por la acción de iones metálicos (cobre, hierro), sustancias prooxidantes o por aplicación de calor.

Dentro de este grupo de métodos, el más usado es el método **Rancimat**<sup>®</sup> es un ensayo de oxidación lipídica acelerada mediante el uso de alta temperatura (normalmente 100°C o una temperatura superior), en el que se mide la conductividad producida por las sustancias volátiles de bajo peso molecular (por ejemplo, el ácido fórmico) generadas por la oxidación de una grasa o aceite comestible<sup>194</sup>. La adición de un antioxidante produce la inhibición de la oxidación y los resultados se obtienen evaluando el período de inducción de un control y la muestra, de modo que a mayor tiempo de inducción mayor actividad antioxidante.

### ***3. OBJETIVOS***





### 3. OBJETIVOS

Nuestro grupo de investigación, en colaboración con el Instituto de la Grasa (CSIC), el Departamento de Farmacología y Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga, el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición de Madrid (ICTAN, CSIC) y el centro Venta del Llano (Mengibar, Jaén) del Instituto de Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) de la Junta de Andalucía, se ha dedicado en los últimos años al estudio de los derivados de hidroxitirosol y otros biofenoles presentes en el aceite de oliva virgen, así como a la preparación de nuevos derivados de dichos fenoles que presentaran una actividad antioxidante comparable y un balance hidrófilo/lipófilo mejorado. Estos derivados, ésteres e isocromanos de hidroxitirosol, debían ser, además, accesibles mediante procesos sintéticos simples a partir de hidroxitirosol procedente del alpechín y/o alperujo, productos de desecho muy abundantes en la Comunidad Andaluza, lo cual permitiría disponer de aditivos antioxidantes potentes y económicos.

Del estudio del metabolismo de los ésteres anteriormente mencionados, se deduce que éstos son hidrolizados casi en su totalidad en el tracto digestivo tras su ingesta, generando hidroxitirosol libre, poco biodisponible a nivel intestinal. Otros derivados lipofílicos de este tipo de compuestos fenólicos, más resistentes a la hidrólisis ácida, podrían pasar intactos en su mayor parte al torrente circulatorio, con lo que además de sus propiedades antioxidantes en alimentos grasos, poseerían funcionalidad de modo que pudieran mantener su actividad biológica y sus potenciales efectos beneficiosos sobre la salud tras su ingesta.

Por ello, y en base a los antecedentes descritos en el apartado anterior, los objetivos propuestos al comienzo del trabajo de investigación que se recoge en la presente Memoria fueron los siguientes:

### **3.1. Síntesis de éteres alquílicos derivados de compuestos fenólicos presentes en el olivo**

Se han preparado series homólogas de éteres alquílicos derivados de compuestos fenólicos presentes en el olivo, en los que el número de átomos de carbono de la cadena alquílica lateral varía desde 1 hasta 18. Para ello se han utilizado como productos de partida tres de los compuestos que están presentes en la fracción fenólica del AOV como son el hidroxitirosol (**1**), tirosol (**2**) y alcohol homovanílico (**3**). Como fuente de hidroxitirosol se ha empleado un extracto enriquecido procedente del alperujo, proporcionado por el grupo del Dr. Juan Fernández Bolaños del Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla), el cual ha sido purificado antes de su utilización. La variabilidad de compuestos obtenidos nos ha permitido, por un lado, la modulación de la lipofilia, y por otro, estudiar la relación estructura química-actividad antioxidante para este tipo de compuestos.

Asimismo, se propone la síntesis de derivados de otro tipo de compuesto en el que los *OH* fenólicos se encuentran protegidos por un puente metilideno.

### **3.2. Síntesis de hidroxitirosol y nuevas formas protegidas**

Se presenta una alternativa para la síntesis de hidroxitirosol (**1**) a partir de tirosol (**2**) comercial mediante una oxidación del tipo Baeyer-Villiger como etapa clave en el esquema sintético seguido. Esta etapa de la investigación se ha llevado a cabo en colaboración con el grupo del Profesor Giovanni Zappia del Dipartimento di Scienze Biomolecolari della Università degli Studi "Carlo Bo" de Urbino, Italia.

### **3.3. Evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos sintetizados mediante métodos químicos**

Una vez sintetizados, se ha procedido a estudiar la actividad antioxidante de los éteres alquílicos obtenidos, comparando su comportamiento con sustancias patrones, tales como: los propios compuestos fenólicos de partida hidroxitirosol (1), tirosol (2) y alcohol homovanílico (3), además del butilhidroxitolueno (BHT, 43) y el  $\alpha$ -tocoferol (4). Para ello, y dada la conveniencia de utilizar más de un método de estudio como ha quedado recogido en el apartado 2.8. de los antecedentes, se han escogido cuatro métodos diferentes para tal evaluación. Estos estudios se han llevado a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Raquel Mateos tanto en el centro Venta del Llano (IFAPA, Jaén) como en el ICTAN (CSIC, Madrid).

#### ***3.3.1. Método Rancimat®***

Se ha evaluado la estabilidad oxidativa de una matriz lipídica (aceite de girasol purificado) previamente sembrada con cantidades crecientes de las distintas sustancias estudiadas. Este ensayo se realiza en un ambiente completamente apolar.

#### ***3.3.2. Método FRAP (Ferric Reducing/antioxidant power)***

Se trata de un método de evaluación en medio polar basado en la reducción del complejo TPTZ-Fe(III) por acción del antioxidante analizado.

### ***3.3.3. Método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico)***

Se basa en la inhibición de la absorbancia a 730nm del radical catión ABTS<sup>•+</sup>, cromóforo verde-azulado que se reduce en presencia del antioxidante perdiendo color proporcionalmente.

### ***3.3.4. Método ORAC (Oxygen Radical Scavenging Capacity)***

Este método da una medida directa de la capacidad antioxidante frente a radicales peroxilo tanto de compuestos hidrofílicos como lipofílicos.

## **3.4. Determinación de la actividad biológica de los compuestos sintetizados**

### ***3.4.1. Evaluación de la lipoperoxidación lipídica de la membrana de los glóbulos rojos y de la hemólisis oxidativa***

Estos ensayos se han llevado a cabo en colaboración con el Dipartimento di Scienze Biomolecolari della Univesità degli Studi "Carlo Bo" di Urbino (Italia).

El objetivo ha sido evaluar la capacidad de protección de los nuevos éteres de hidroxitirosilo sintetizados en glóbulos rojos frente a su oxidación forzada determinando la producción de malondialdehido (MDA), uno de los productos derivados de la peroxidación lipídica, así como la protección frente a la hemólisis.

### ***3.4.2. Estudio de la actividad anticancerígena***

Estos ensayos se han llevado a cabo en el Departamento de Farmacología y Farmacocinética de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. En ellos se ha evaluado la actividad citotóxica de estos compuestos, así como la posible selectividad de los mismos frente a células cancerígenas.



## ***4. MATERIALES Y MÉTODOS***





## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Productos comerciales

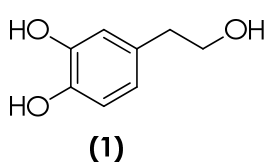
Las sustancias comerciales usadas han sido las siguientes:

- 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) amónico 98% (Sigma)
- 2,2'-Azo-bis-(2-metilpropionamida)dihidrocloruro 97% (AAPH) (Aldrich)
- 2,4,6-tris-(2-Piridil)-1,3,5-triazina 98% (TPTZ) (Sigma)
- 2,6-di-*terc*-Butil-4-metilfenol (BHT) (Aldrich)
- Acetona (Sigma-Aldrich)
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Aldrich)
- Ácido clorhídrico (Panreac)
- Ácido 3,4-dihidroxifenilacético (Sigma)
- Ácido fosfomolibdico (Fluka)
- Ácido 2-(3,4-dioximetilidén)fenilacético (Sigma)
- Ácido *m*-cloroperbenzoico (Aldrich)
- Ácido *p*-toluenosulfónico (Sigma)
- Alcohol homovanílico (Aldrich)
- Bromuro de bencilo (Fluka)
- Carbonato potásico (Aldrich)
- $\beta$ -Ciclodextrina (RMCD) (Sigma)
- Disoluciones de NH<sub>3</sub> 2M y 4M en metanol (Aldrich)
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (Panreac)
- Dimetil sulfóxido hexadeuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (Aldrich)
- Estreptomicina (C. Viral)
- Fluoresceína (Sigma)
- *p*-Formaldehído (Panreac)
- Glutamina (C. Viral)
- Hidróxido potásico (Fluka)

- Líneas celulares de adenocarcinoma humano HT-29 de colon, A549 de pulmón y MCF7 de mama (European Collection of Cell Cultures)
- Línea celular de fibroblastos MRC-5 y MCF10 de mama (European Collection of Cell Cultures)
- Medio de cultivo DMEM rico en glucosa (Gbico)
- Paladio sobre carbón (C-Pd) (Aldrich)
- Penicilina (C. Viral)
- Seleniuro de difenilo (Aldrich)
- Suero Fetal Bovino (C. Viral)
- Tetrahidrofurano (THF) (Scharlau)
- Tirosol (Aldrich)
- $\alpha$ -Tocoferol (Aldrich)
- Tripsina (C. Viral)
- Yoduros de metilo, etilo, propilo, butilo, hexilo, octilo, decilo, dodecilo, hexadecilo y octadecilo (Sigma-Aldrich)

## 4.2. Sustancias de partida

### 4.2.1. Aislamiento y purificación de hidroxitirosol a partir de alperujo



El aislamiento del hidroxitirosol a partir de los residuos derivados de las aguas residuales procedentes del prensado de las aceitunas ha sido realizado mediante un procedimiento patentado por Fernández-Bolaños y *col.*<sup>88</sup>.

Brevemente, este procedimiento consiste en:

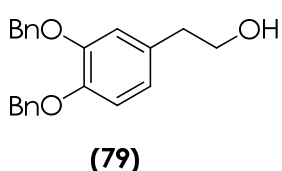
1) un tratamiento previo del alperujo al vapor, por inyección de vapor de agua a presión durante un corto período de tiempo. De esta forma se consigue la solubilización del hidroxitirosol y de otros muchos compuestos solubles en agua presentes en el alperujo.

2) un sistema cromatográfico en dos fases, utilizándose en la primera columna una resina de intercambio iónico en ciertas condiciones, que permite la purificación parcial del hidroxitirosol sin que éste sufra alteración alguna, tras su elución simplemente con agua, obteniéndose una disolución que contiene al menos el 85% del hidroxitirosol contenido en la disolución introducida en la columna. La segunda columna se realiza utilizando una resina adsorbente polimérica XAD que permite la purificación total del hidroxitirosol procedente de la etapa anterior, tras eluir con una mezcla de metanol o etanol/agua (30:70), obteniéndose una disolución que contiene al menos el 75% del hidroxitirosol contenido en la fuente de hidroxitirosol introducida en la primera etapa.

La disolución hidroalcohólica así obtenida fue amablemente suministrada por el grupo del Dr. Fernández-Bolaños con una pureza de entre el 85 y 96%. Para su posterior purificación se ha procedido como sigue: se liofiliza hasta sequedad empleándose para ello un equipo liofilizador Virtis, obteniéndose un residuo crudo con 3,5g de hidroxitirosol por litro. Este residuo crudo se cromatografía en columna usando como eluyente una mezcla de *t*-butilmetil éter/hexano (inicialmente 1:1 y después 2:1) para rendir el hidroxitirosol completamente puro.

#### 4.2.2. Protección de los OH fenólicos

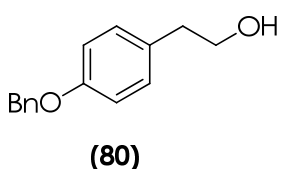
##### 4.2.2.1. Reacción de dibencilación de hidroxitirosol (1)



Una disolución de **1** (1mmol) en acetona seca (20mL) se hace reaccionar con bromuro de bencilo (2,2 mmoles) en presencia de carbonato potásico ( $K_2CO_3$ ) (2 mmoles) a reflujo durante 24 horas. La suspensión obtenida se filtra, se evapora y el producto obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano (1:2). Se obtiene el producto puro como un sólido blanco con

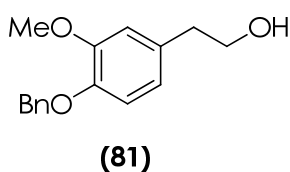
rendimiento medio del 67%. P.f.: 55-57°C. Los datos espectroscópicos están de acuerdo con los recogidos en la bibliografía<sup>195</sup>.

#### 4.2.2.2. Reacción de bencilación de tirosol (2)



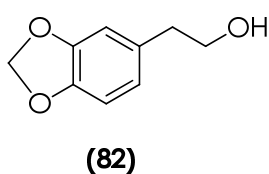
Se sigue el procedimiento descrito anteriormente obteniéndose el producto puro como un sólido blanco con rendimiento medio del 75%. P.f.: 85-87°C. Los datos espectroscópicos están de acuerdo con los recogidos en la bibliografía<sup>196</sup>.

#### 4.2.2.3. Reacción de bencilación de alcohol homovanílico (3)



Se sigue el procedimiento descrito anteriormente obteniéndose el producto puro como un sólido blanco con rendimiento medio del 75%. P.f.: 54,5-55,5°C. Los datos espectroscópicos están de acuerdo con los recogidos en la bibliografía<sup>197</sup>.

#### 4.2.3. Síntesis de 2-(3',4'-dioximetilidén)feniletanol (82)



Una disolución de ácido 2-(3',4'-dioximetilidén)fenilacético (1 g, 5,55 mmoles) en 30 mL de tetrahidrofurano (THF) seco se adiciona con cuidado sobre 170 mL de una disolución 1M de hidruro de aluminio y litio y se calienta a reflujo durante cuatro horas. Se enfría a temperatura ambiente y se añaden con precaución 50 mL de acetato de etilo y 10 mL de agua destilada, concentrándose a continuación a presión reducida. El residuo se suspende en agua (50 mL) y se acidula con ácido clorhídrico 6M a pH 2-3. Se extrae con acetato de etilo (7×100 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> hasta pH 8,5, secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtran y evaporan a sequedad, para rendir un residuo oleoso (760 mg,

82,8%). El compuesto se purifica por cromatografía en columna usando una mezcla de acetato de etilo/hexano (1:2) como eluyente, rindiendo el compuesto **82** con un rendimiento medio del 80% como un sirupo de color amarillo claro. Los datos espectroscópicos están de acuerdo con los ya publicados<sup>198</sup>.

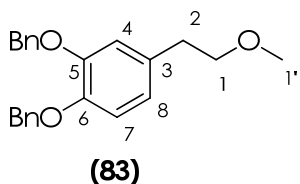
### 4.3. Síntesis de las nuevas sustancias

#### 4.3.1. Reacción de alquilación. Procedimiento general

Una disolución del bencil derivado correspondiente (1 mmol) en DMSO (15mL) se hace reaccionar con el ioduro de alquilo correspondiente (3 mmoles) en presencia de KOH recién pulverizado (6 mmoles). La mezcla se mantiene en agitación magnética a temperatura ambiente durante el tiempo necesario (aproximadamente 4 horas) confirmando que la reacción ha transcurrido completamente mediante cromatografía en capa fina (ccf). La mezcla de reacción se procesa de la siguiente forma: se acidula con disolución 3M de HCl (25mL), y se extrae con cloroformo (3×25mL). Los extractos orgánicos reunidos se lavan con una disolución al 2% de hidrógeno sulfito sódico (NaHSO<sub>3</sub>, 2×25mL) y agua destilada (25mL). Finalmente, se secan, filtran y evaporan. El producto buscado se purifica mediante cromatografía en columna.

##### 4.3.1.1. Reacción de alquilación del dibencil hidroxitirosol (**79**)

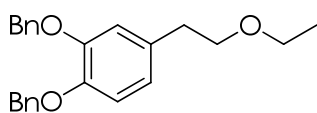
###### • 1,2-bis(benciloxi)-4-(2'-metoxietil)benceno (**83**)



Se prepara siguiendo el procedimiento general usando una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:5 como eluyente para la columna de cromatografía. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (81%). IR: 3050

( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^2-\text{H}}}$ ), 2865 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}}$ ), 1509, 1485 y 1455 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1264 y 1113 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 10H, 2 x Ph), 6,95 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,93 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,72 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,09 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 5,07 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,46 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,21 (s, 3H,  $H_{1'}$ ), 2,69 (t, 2H,  $H_2$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 148,1 ( $\text{C}_5$ ), 146,6 ( $\text{C}_6$ ), 137,5 y 137,4 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupos Bn), 132,1 ( $\text{C}_3$ ), 128,3-127,4 ( $\text{C}_{3''}$ ,  $\text{C}_{4''}$  y  $\text{C}_{5''}$ , grupos Bn), 121,3 ( $\text{C}_8$ ), 115,4 ( $\text{C}_4$ ), 114,7 ( $\text{C}_7$ ), 72,9 ( $\text{C}_1$ ), 70,3 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 70,1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 57,7 ( $\text{C}_{1'}$ ), 34,8 ( $\text{C}_2$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 348 (13%), 257 (3%), 181 (4%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 348,1722 (0,9 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_3$ : C, 79,28; H, 6,94. Encontrado: C, 78,75; H, 6,87.

• 1,2-bis(benciloxi)-4-(2'-etoxietil)benceno (84)

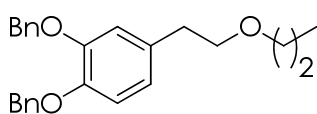


(84)

Se prepara siguiendo el procedimiento general usando una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:5 como eluyente para la columna de cromatografía. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (90%). **IR**: 3085

( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^2-\text{H}}}$ ), 2863 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}}$ ), 1538, 1509 y 1455 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1263 y 1135 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 10H, 2 x Ph), 6,96 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,93 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,72 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,09 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  in pos. 5), 5,07 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,49 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,39 (c,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,69 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,07 (t, 3H,  $H_{2'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 148,1 ( $\text{C}_5$ ), 146,6 ( $\text{C}_6$ ), 137,5 y 137,4 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupos Bn), 132,2 ( $\text{C}_3$ ), 128,3-127,4 ( $\text{C}_{3''}$ ,  $\text{C}_{4''}$  y  $\text{C}_{5''}$ , grupos Bn), 121,3 ( $\text{C}_8$ ), 115,4 ( $\text{C}_4$ ), 114,7 ( $\text{C}_7$ ), 70,7 ( $\text{C}_1$ ), 70,2 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 70,1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 65,1 ( $\text{C}_{1'}$ ), 35,1 ( $\text{C}_2$ ), 15,0 ( $\text{C}_{2'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 362 (28%), 271 (4%), 181 (10%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 362,1890 (2,4 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_3 \times \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ : C, 77,60; H, 7,33. Encontrado: C, 77,99; H, 6,91.

• 1,2-bis(benciloxi)-4-(2'-propoxietil)benceno (85)

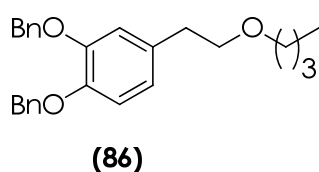


(85)

Se prepara siguiendo el procedimiento general usando una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:10 como eluyente para la columna de cromatografía. Se

obtiene el producto puro como un líquido incoloro (78%). **IR:** 3031 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^2-\text{H}}$ ), 2934 y 2861 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1538, 1509 y 1485 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1264 y 1136 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 10H, 2 x Ph), 6,96 (d,  $J = 2$ , Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,93 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,72 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,09 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 5,07 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,49 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,30 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,69 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,47 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 0,83 (t, 3H,  $H_{3'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 148,1 ( $\text{C}_5$ ), 146,6 ( $\text{C}_6$ ), 137,4 y 137,3 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupos Bn), 132,2 ( $\text{C}_3$ ), 128,3-127,4 ( $\text{C}_{3''}$ ,  $\text{C}_{4''}$  y  $\text{C}_{5''}$ , grupos Bn), 121,3 ( $\text{C}_8$ ), 115,5 ( $\text{C}_4$ ), 114,7 ( $\text{C}_7$ ), 71,5 ( $\text{C}_{1'}$ ), 70,9 ( $\text{C}_1$ ), 70,2 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 70,1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 35,1 ( $\text{C}_2$ ), 22,4 ( $\text{C}_{2'}$ ), 10,4 ( $\text{C}_{3'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 376 (9%), 285 (2%), 181 (4%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 376,2051 (3,5 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_3$ : C, 79,75; H, 7,50. Encontrado: C, 79,15; H, 6,88.

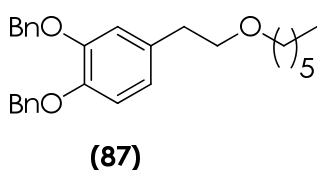
• 1,2-bis(benciloxi)-4-(2'-butoxi)etil)benceno (86)



Se prepara siguiendo el procedimiento general usando una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:11 como eluyente para la columna de cromatografía. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (91%). **IR:** 3031 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^2-\text{H}}$ ), 2932 y 2862 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1509, 1485 y 1455 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1264 y 1136 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 10H, 2 x Ph), 6,96 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,93 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,72 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,08 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 5,07 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,49 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,34 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,69 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,44 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,28 (m, 2H,  $H_{3'}$ ), 0,85 (t, 3H,  $H_{4'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 148,1 ( $\text{C}_5$ ), 146,6 ( $\text{C}_6$ ), 137,5 y 137,4 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupos Bn), 132,2 ( $\text{C}_3$ ), 128,3-127,4 ( $\text{C}_{3''}$ ,  $\text{C}_{4''}$  and  $\text{C}_{5''}$ , grupos Bn), 121,3 ( $\text{C}_8$ ), 115,5 ( $\text{C}_4$ ), 114,7 ( $\text{C}_7$ ), 71,0 ( $\text{C}_1$ ), 70,2 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 70,1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 69,6 ( $\text{C}_{1'}$ ), 35,1 ( $\text{C}_2$ ), 31,3 ( $\text{C}_{2'}$ ), 18,8 ( $\text{C}_{3'}$ ), 13,7 ( $\text{C}_{4'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 390 (10%), 299 (3%), 181 (4%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 390,2184 (2,6 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_3$ : C, 79,97; H, 7,74. Encontrado: C, 79,52; H, 7,38.

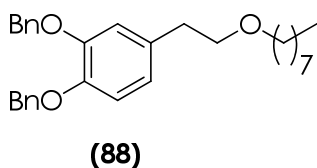


• 1,2-bis(benciloxi)-4-(2'-hexiloxietil)benceno (87)



Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla éter/hexano 1:15. Se obtiene el producto puro como un líquido incoloro (88%). **IR:** 3030 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}2-\text{H}}$ ), 2930 y 2857 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}3-\text{H}}$ ), 1538, 1509 y 1485 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1264 y 1108 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 10H, 2 x Ph), 6,96 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,93 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,72 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,08 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 5,07 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,49 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,33 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,69 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,24 (m, 6H,  $H_{3'-H_{5'}}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{6'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 148,1 ( $\text{C}_5$ ), 146,6 ( $\text{C}_6$ ), 137,5 y 137,4 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupos Bn), 132,2 ( $\text{C}_3$ ), 128,3-127,4 ( $\text{C}_{3''}$ ,  $\text{C}_{4''}$  y  $\text{C}_{5''}$ , grupos Bn), 121,3 ( $\text{C}_8$ ), 115,5 ( $\text{C}_4$ ), 114,7 ( $\text{C}_7$ ), 71,0 ( $\text{C}_1$ ), 70,2 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 70,1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 69,9 ( $\text{C}_{1'}$ ), 35,1 ( $\text{C}_2$ ), 31,0 ( $\text{C}_{4'}$ ), 29,1 ( $\text{C}_{2'}$ ), 25,3 ( $\text{C}_{3'}$ ), 22,0 ( $\text{C}_{5'}$ ), 13,8 ( $\text{C}_{6'}$ ). **EM (CI)**,  $m/z$  (int. relativa): 418 (17%), 327 (3%), 181 (6%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 418,2503 (1,0 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_3$ : C, 80,35; H, 8,19. Encontrado: C, 79,95; H, 7,86.

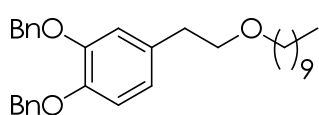
• 1,2-bis(benciloxi)-4-(2'-octiloxietil)benceno (88)



Se prepara siguiendo el procedimiento general usando una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:13 como eluyente para la columna de cromatografía. Se obtiene el producto puro como un sólido blanco (86%). **P.f.:** 52–54°C. **IR:** 3019 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}2-\text{H}}$ ), 2919 y 2848 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}3-\text{H}}$ ), 1509, 1455 y 1455 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1263 y 1108 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 10H, 2 x Ph), 6,96 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,93 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,72 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,08 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 5,07 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,49 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,33 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,69 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,23 (m, 10H,  $H_{3'-H_{7'}}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{8'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 148,1 ( $\text{C}_5$ ), 146,6 ( $\text{C}_6$ ), 137,4 y 137,3 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupos Bn), 132,2 ( $\text{C}_3$ ), 128,2-127,4 ( $\text{C}_{3''}$ ,  $\text{C}_{4''}$  y  $\text{C}_{5''}$ , grupos Bn), 121,3 ( $\text{C}_8$ ), 115,4 ( $\text{C}_4$ ), 114,7 ( $\text{C}_7$ ), 71,0 ( $\text{C}_1$ ), 70,2 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 70,1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 69,9 ( $\text{C}_{1'}$ ), 35,1 ( $\text{C}_2$ ), 31,2 ( $\text{C}_{6'}$ ), 29,1 ( $\text{C}_{2'}$ ), 28,7 ( $\text{C}_{4'}$ ), 28,6 ( $\text{C}_{5'}$ ), 25,7 ( $\text{C}_{3'}$ ), 22,0

(C<sub>7'</sub>), 13,8 (C<sub>8'</sub>). **EM** (Cl), *m/z* (int. relativa): 446 (67%), 355 (3%), 181 (8%), 91 (100%). **EM-AR** *m/z*: 446,2825 (0,9 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>: C, 80,68; H, 8,58. Encontrado: C, 80,35; H, 8,75.

• 1,2-bis(benciloxi)-4-(2'-deciloxietil)benceno (89)

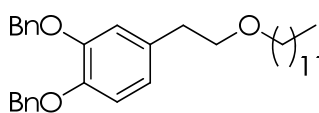


(89)

Se prepara siguiendo el procedimiento general usando una mezcla acetato de etilo/hexano 1:18 como eluyente para la columna de cromatografía. Se obtiene el producto puro como un sólido blanco (86%).

**P.f.:** 49-51°C. **IR:** 3019 (ν<sub>C<sub>sp</sub>2-H</sub>), 2916 y 2847 (ν<sub>C<sub>sp</sub>3-H</sub>), 1589, 1515 y 1467 (ν<sub>Ar</sub>), 1258 y 1107 (ν<sub>C-O</sub>) cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 7,37 (m, 10H, 2xPh), 6,96 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6,92 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6,71 (dd, 1H, H<sub>8</sub>), 5,07 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph en pos. 5), 5,06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph en pos. 6), 3,48 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 3,32 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, H<sub>1'</sub>), 2,68 (t, 2H, H<sub>2</sub>), 1,43 (m, 2H, H<sub>2'</sub>), 1,23 (m, 14H, H<sub>3'-H<sub>9'</sub></sub>), 0,83 (t, 3H, H<sub>10'</sub>). **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 148,2 (C<sub>5</sub>), 146,6 (C<sub>6</sub>), 137,4 y 137,3 (C<sub>ipso</sub>, grupos Bn), 132,2 (C<sub>3</sub>), 128,2-127,4 (C<sub>3''</sub>, C<sub>4''</sub> y C<sub>5''</sub>, Bn grupos), 121,2 (C<sub>8</sub>), 115,4 (C<sub>4</sub>), 114,6 (C<sub>7</sub>), 70,9 (C<sub>1</sub>), 70,2 (CH<sub>2</sub>Ph en pos. 6), 70,1 (CH<sub>2</sub>Ph en pos. 5), 69,8 (C<sub>1'</sub>), 35,0 (C<sub>2</sub>), 29,1 (C<sub>2'</sub>), 29,0-28,6 (C<sub>4'-C<sub>7'</sub></sub>), 25,6 (C<sub>3'</sub>), 31,2 (C<sub>8'</sub>), 22,0 (C<sub>9'</sub>), 13,8 (C<sub>10'</sub>). **EM** (Cl), *m/z* (int. relativa): 474 (21%), 383 (4%), 181 (9%), 91 (100%). **EM-AR** *m/z*: 474,3124 (-2,1 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>: C, 80,97; H, 8,92. Encontrado: C, 88,85; H, 8,78.

• 1,2-bis(benciloxi)-4-(2'-dodeciloxietil)benceno (90)



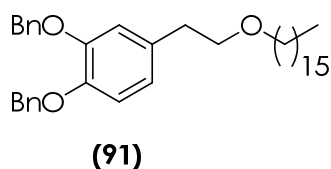
(90)

Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:15. Se obtiene el producto puro como un sólido blanco (67%).

**P.f.:** 42-45°C. **IR:** 3025 (ν<sub>C<sub>sp</sub>2-H</sub>), 2925 y 2854 (ν<sub>C<sub>sp</sub>3-H</sub>), 1589, 1513 y 1485 (ν<sub>Ar</sub>), 1264 y 1110 (ν<sub>C-O</sub>) cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 7,37 (m, 10H, 2 x Ph), 6,96 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6,93 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6,72 (dd, 1H, H<sub>8</sub>), 5,08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph en pos. 5), 5,06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph en pos. 6), 3,49 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 3,33 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, H<sub>1'</sub>), 2,69 (t, 2H, H<sub>2</sub>), 1,45 (m, 2H, H<sub>2'</sub>), 1,22 (m, 18H,

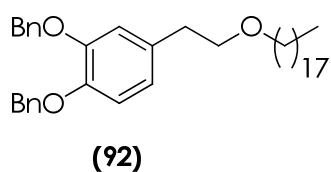
$H_{3'}-H_{11'}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{12'}$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 148,1 ( $C_5$ ), 146,6 ( $C_6$ ), 137,4 y 137,3 ( $C_{\text{ipso}}$ , grupos Bn), 132,2 ( $C_3$ ), 128,2-127,4 ( $C_{3''}$ ,  $C_{4''}$  y  $C_{5''}$ , grupos Bn), 121,3 ( $C_8$ ), 115,4 ( $C_4$ ), 114,7 ( $C_7$ ), 70,9 ( $C_1$ ), 70,3 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 70,1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 69,9 ( $C_{1'}$ ), 35,1 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{10'}$ ), 29,1 ( $C_{2'}$ ), 29,0–28,6 ( $C_{4'}-C_{9'}$ ), 25,7 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{11'}$ ), 13,8 ( $C_{12'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 502 (16%), 411 (4%), 316 (3%), 225 (4%), 181 (7%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 502,3447 (0,1 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{O}_3$ : C, 81,23; H, 9,22. Encontrado: C, 81,01; H, 9,07.

• 1,2-bis(benciloxi)-4-(2'-hexadeciloxietil)benceno (91)



Se prepara siguiendo el procedimiento general usando una mezcla acetato de etilo/hexano 1:30 como eluyente para la columna de cromatografía. Se obtiene el producto puro como un sólido blanco (86%). **P.f.:** 55–57°C. **IR:** 3019 ( $\nu_{\text{Csp}2-\text{H}}$ ), 2916 y 2847 ( $\nu_{\text{Csp}3-\text{H}}$ ), 1589, 1515 y 1467 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1258 y 1107 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 10H, 2 x Ph), 6,96 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,93 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,72 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,08 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 5,07 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,49 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,33 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,69 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,23 (m, 10H,  $H_{3'}-H_{15'}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{16'}$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 148,1 ( $C_5$ ), 146,6 ( $C_6$ ), 137,4 y 137,3 ( $C_{\text{ipso}}$ , grupos Bn), 132,2 ( $C_3$ ), 128,2-127,4 ( $C_{3''}$ ,  $C_{4''}$  y  $C_{5''}$ , grupos Bn), 121,3 ( $C_8$ ), 115,5 ( $C_4$ ), 114,7 ( $C_7$ ), 70,9 ( $C_1$ ), 70,2 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 70,1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 69,8 ( $C_{1'}$ ), 35,0 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{14'}$ ), 29,1 ( $C_{2'}$ ), 29,0–28,6 ( $C_{4'}-C_{13'}$ ), 25,6 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{15'}$ ), 13,8 ( $C_{16'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 558 (25%), 467 (5%), 181 (11%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 558,4070 (0,5 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{O}_3$ : C, 81,67; H, 9,74; encontrado: C, 81,27; H, 9,35.

• 1,2-bis(benciloxi)-4-(2'-octadeciloxietil)benceno (92)

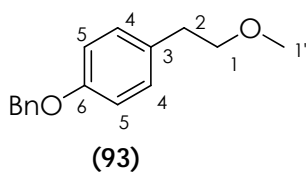


Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:30. Se obtiene el producto puro como un sólido

blanco (60%). **P.f.** 57–59°C. **IR:** 3025 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}2-\text{H}}$ ), 2915 y 2847 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}3-\text{H}}$ ), 1589, 1515 y 1467 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1258 y 1108 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 10H, 2 x Ph), 6,96 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,93 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,72 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,08 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 5,06 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,49 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,33 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,69 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,22 (m, 30H,  $H_{3'-H_{17'}}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{18'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 148,1 ( $\text{C}_5$ ), 146,6 ( $\text{C}_6$ ), 137,4 y 137,3 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupos Bn), 132,2 ( $\text{C}_3$ ), 128,2–127,4 ( $\text{C}_{3''}$ ,  $\text{C}_{4''}$  y  $\text{C}_{5''}$ , grupos Bn), 121,3 ( $\text{C}_8$ ), 115,5 ( $\text{C}_4$ ), 114,7 ( $\text{C}_7$ ), 70,9 ( $\text{C}_1$ ), 70,2 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 70,1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 5), 69,8 ( $\text{C}_{1'}$ ), 35,0 ( $\text{C}_2$ ), 31,2 ( $\text{C}_{16'}$ ), 29,1 ( $\text{C}_{2'}$ ), 29,0–28,6 ( $\text{C}_{4'-\text{C}_{15'}}$ ), 25,6 ( $\text{C}_{3'}$ ), 22,0 ( $\text{C}_{17'}$ ), 13,8 ( $\text{C}_{18'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 586 (22%), 495 (3%), 181 (9%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 586,4385 (0,1 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{40}\text{H}_{58}\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : C, 79,42; H, 10,00. Encontrado: C, 79,31; H, 10,00.

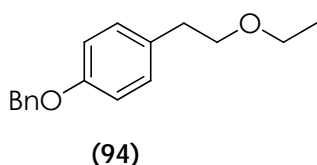
#### 4.3.1.2. Reacción de alquilación del bencil tirosol (80)

##### • 1-(Benciloxi)-4-(2'-metoxietil)benceno (93)



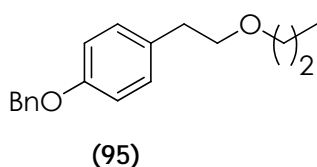
Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:10. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (85%). **IR:** 3101 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}2-\text{H}}$ ), 2971 y 2931 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}3-\text{H}}$ ), 1611, 1580 y 1520 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1237 y 1115 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 5H, Ph), 7,12 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 6,90 (d, 2H,  $H_4$ ), 5,05 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,46 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,21 (s, 3H,  $H_{1'}$ ), 2,71 (t, 2H,  $H_2$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 156,6 ( $\text{C}_6$ ), 137,2 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupo Bn), 131,1 ( $\text{C}_3$ ), 129,7 ( $\text{C}_4$ ), 128,3–127,5 ( $\text{C}_{2''}$ – $\text{C}_{4''}$ , grupo Bn), 114,5 ( $\text{C}_5$ ), 72,9 ( $\text{C}_1$ ), 69,1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 57,7 ( $\text{C}_{1'}$ ), 34,4 ( $\text{C}_2$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 242 (17%), 197 (12%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 242,1302 (2 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_2$ : C, 79,31; H, 7,49. Encontrado: C, 79,27; H, 7,27.

• 1-(Benciloxi)-4-(2'-etoxietil)benceno (94)



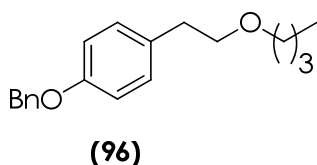
Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:10. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (89%). **IR:** 3101 ( $\nu_{\text{Csp}2-\text{H}}$ ), 2971 y 2931 ( $\nu_{\text{Csp}3-\text{H}}$ ), 1611, 1580 y 1520 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1237 y 1115 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 5H, Ph), 7,12 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 6,90 (d, 2H,  $H_4$ ), 5,05 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,49 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,39 (c,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,71 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,07 (t, 3H,  $H_2'$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 156,6 ( $\text{C}_6$ ), 137,2 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupo Bn), 131,1 ( $\text{C}_3$ ), 129,5 ( $\text{C}_4$ ), 128,3-127,5 ( $\text{C}_{2''}$ - $\text{C}_{4''}$ , grupo Bn), 114,9 ( $\text{C}_5$ ), 71,1 ( $\text{C}_1$ ), 69,1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 65,1 ( $\text{C}_{1'}$ ), 34,7 ( $\text{C}_2$ ), 15,0 ( $\text{C}_{2'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 256 (18%), 197 (14%), 165 (2%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 256,1465 (0,7 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_2$ : C, 79,65; H, 7,86. Encontrado: C, 79,46; H, 7,95.

• 1-(Benciloxi)-4-(2'-propoxietil)benceno (95)



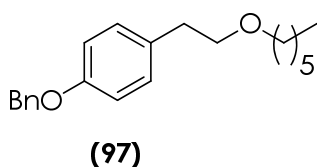
Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:15. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (89%). **IR:** 3063 ( $\nu_{\text{Csp}2-\text{H}}$ ), 2959 y 2934 ( $\nu_{\text{Csp}3-\text{H}}$ ), 1611, 1583 y 1520 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1238 y 1106 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 5H, Ph), 7,12 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 6,90 (d, 2H,  $H_4$ ), 5,05 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,49 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,31 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,71 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,47 (m, 2H,  $H_2'$ ) 0,83 (t, 3H,  $H_3'$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 156,6 ( $\text{C}_6$ ), 137,2 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupo Bn), 131,1 ( $\text{C}_3$ ), 129,6 ( $\text{C}_4$ ), 128,3-127,5 ( $\text{C}_{2''}$ - $\text{C}_{4''}$ , grupo Bn), 114,4 ( $\text{C}_5$ ), 71,5 ( $\text{C}_{1'}$ ), 71,0 ( $\text{C}_1$ ), 69,1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 34,6 ( $\text{C}_2$ ), 22,3 ( $\text{C}_{2'}$ ), 10,4 ( $\text{C}_{3'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 270 (53%), 197 (11%), 179 (2%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 270,1630 (3,8 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_2$ : C, 79,96; H, 8,20. Encontrado: C, 80,17; H, 8,18.

• 1-(Benciloxi)-4-(2'-butoxietil)benceno (96)



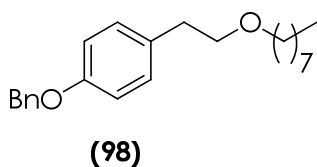
Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:20. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (87%). **IR:** 3053 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^2-\text{H}}$ ), 2957 y 2929 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1611, 1583 y 1520 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1238 y 1106 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 5H, *Ph*), 7,12 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 6,90 (d,  $H_4$ ), 5,05 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,49 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,34 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,71 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,44 (m, 2H,  $H_{2'}$ ) 1,27 (m, 2H,  $H_{3'}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{4'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 156,6 ( $\text{C}_6$ ), 137,2 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupo *Bn*), 131,1 ( $\text{C}_3$ ), 129,6 ( $\text{C}_4$ ), 128,3-127,5 ( $\text{C}_{2''}$ - $\text{C}_{4''}$ , grupo *Bn*), 114,4 ( $\text{C}_5$ ), 71,1 ( $\text{C}_1$ ), 69,5 ( $\text{C}_{1'}$ ), 69,1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 34,6 ( $\text{C}_2$ ), 31,2 ( $\text{C}_{2'}$ ), 18,7 ( $\text{C}_{3'}$ ), 13,6 ( $\text{C}_{4'}$ ). **EM (CI)**,  $m/z$  (int. relativa): 284 (34%), 197 (13%), 193 (2%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 284,1775 (0,5 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_2$ : C, 80,24; H, 8,51. Encontrado: C, 80,21; H, 8,68.

• 1-(Benciloxi)-4-(2'-hexiloxietil)benceno (97)



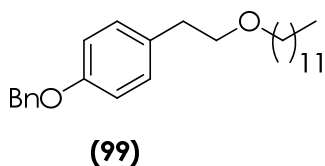
Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:20. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (73%). **IR:** 3042 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^2-\text{H}}$ ), 2929 y 2856 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1612, 1583 y 1509 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1237 y 1108 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 5H, *Ph*), 7,12 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 6,89 (d, 2H,  $H_4$ ), 5,05 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,49 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,33 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,70 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,44 (m, 2H,  $H_{2'}$ ) 1,22 (m, 6H,  $H_{3'}-H_{5'}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{6'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 156,6 ( $\text{C}_6$ ), 137,2 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupo *Bn*), 131,1 ( $\text{C}_3$ ), 129,6 ( $\text{C}_4$ ), 128,3-127,5 ( $\text{C}_{2''}$ - $\text{C}_{4''}$ , grupo *Bn*), 114,4 ( $\text{C}_5$ ), 71,0 ( $\text{C}_1$ ), 69,8 ( $\text{C}_{1'}$ ), 69,0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 34,6 ( $\text{C}_2$ ), 31,0 ( $\text{C}_{4'}$ ), 29,1 ( $\text{C}_{2'}$ ), 25,2 ( $\text{C}_{3'}$ ), 22,0 ( $\text{C}_{5'}$ ), 13,8 ( $\text{C}_{6'}$ ). **EM (CI)**,  $m/z$  (int. relativa): 312 (23%), 221 (3%), 197 (13%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 312,2091 (0,5 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_2$ : C, 80,73; H, 9,03. Encontrado: C, 80,73; H, 9,02.

• 1-(Benciloxi)-4-(2'-octiloxietil)benceno (98)



Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:20. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (75%). **IR:** 3052 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}2-\text{H}}$ ), 2929 y 2849 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}3-\text{H}}$ ), 1612, 1585 y 1509 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1237 y 1108 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 5H, *Ph*), 7,12 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 6,89 (d, 2H,  $H_4$ ), 5,05 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,49 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,33 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,70 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,44 (m, 2H,  $H_{2'}$ ) 1,22 (m, 10H,  $H_{3'-H_7'}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{8'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 156,6 ( $\text{C}_6$ ), 137,2 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupo *Bn*), 131,1 ( $\text{C}_3$ ), 129,6 ( $\text{C}_4$ ), 128,3-127,5 ( $\text{C}_{2''-\text{C}_{4''}}$ , grupo *Bn*), 114,4 ( $\text{C}_5$ ), 71,0 ( $\text{C}_1$ ), 69,8 ( $\text{C}_{1'}$ ), 69,0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 34,6 ( $\text{C}_2$ ), 31,1 ( $\text{C}_{6'}$ ), 29,1 ( $\text{C}_{2'}$ ), 28,7 ( $\text{C}_{4'}$ ), 28,6 ( $\text{C}_{5'}$ ), 25,6 ( $\text{C}_{3'}$ ), 22,0 ( $\text{C}_{7'}$ ), 13,8 ( $\text{C}_{8'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 340 (38%), 249 (2%), 197 (18%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 340,2378 (7,1 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_2$ : C, 81,13; H, 9,47. Encontrado: C, 81,42; H, 9,75.

• 1-(Benciloxi)-4-(2'-dodeciloxietil)benceno (99)

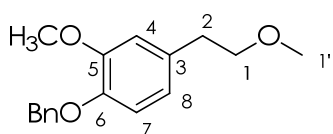


Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:30. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (70%). **IR:** 3042 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}2-\text{H}}$ ), 2929 y 2856 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}3-\text{H}}$ ), 1612, 1583 y 1509 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1237 y 1108 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 5H, *Ph*), 7,12 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 6,89 (d, 2H,  $H_4$ ), 5,05 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,48 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,33 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,70 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,44 (m, 2H,  $H_{2'}$ ) 1,22 (m, 18H,  $H_{3'-H_{11'}}$ ), 0,83 (t, 3H,  $H_{12'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 156,6 ( $\text{C}_6$ ), 137,2 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupo *Bn*), 131,1 ( $\text{C}_3$ ), 129,6 ( $\text{C}_4$ ), 128,3-127,5 ( $\text{C}_{2''-\text{C}_{4''}}$ , grupo *Bn*), 114,4 ( $\text{C}_5$ ), 71,0 ( $\text{C}_1$ ), 69,8 ( $\text{C}_{1'}$ ), 69,0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 34,6 ( $\text{C}_2$ ), 31,2 ( $\text{C}_{10'}$ ), 29,0 ( $\text{C}_{2'}$ ), 29,0-28,5 ( $\text{C}_{4'}$ ,  $\text{C}_{9'}$ ), 25,6 ( $\text{C}_{3'}$ ), 22,0 ( $\text{C}_{11'}$ ), 13,8 ( $\text{C}_{12'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 396 (34%), 305 (2%), 197 (22%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 396,3012 (4,1

ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $C_{27}H_{40}O_2$ : C, 81,77; H, 10,17. Encontrado: C, 81,62; H, 10,10.

#### 4.3.1.3. Reacción de alquilación del alcohol homovanílico bencilado (81)

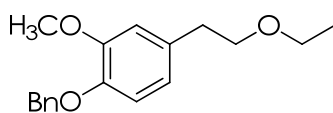
##### • 1-(Benciloxi)-2-metoxi-4-(2'-metoxietil)benceno (100)



(100)

Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:3. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (85%). **IR:** 3042 ( $\nu_{C_{sp2}-H}$ ), 2927 y 2943 ( $\nu_{C_{sp3}-H}$ ), 1607, 1590 y 1512 ( $\nu_{Ar}$ ), 1235 y 1104 ( $\nu_{C-O}$ )  $cm^{-1}$ .  **$^1H$ -RMN** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 5H, Ph), 6,90 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,85 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,69 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,02 (s, 2H,  $CH_2Ph$  en pos. 6), 3,74 (s, 3H, OMe en pos. 5), 3,49 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,22 (s, 3H,  $H_{1'}$ ), 2,71 (t, 2H,  $H_2$ ).  **$^{13}C$ -RMN** (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 149,0 ( $C_5$ ), 146,1 ( $C_6$ ), 137,2 ( $C_{ipso}$ , grupo Bn), 131,9 ( $C_3$ ), 128,3-127,5 ( $C_{2''}$ - $C_{4''}$ , grupo Bn), 120,5 ( $C_8$ ), 113,8 ( $C_7$ ), 113,0 ( $C_4$ ), 72,9 ( $C_1$ ), 70,0 ( $CH_2Ph$  en pos. 6), 57,7 ( $C_{1'}$ ), 55,5 (OMe en pos. 5), 34,8 ( $C_2$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 272 (37%), 181 (14%), 137 (46%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 272,1408 (1,6 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $C_{17}H_{20}O_3$ : C, 74,97; H, 7,40. Encontrado: C, 75,41; H, 7,15.

##### • 1-(Benciloxi)-4-(2'-etiloxietil)-2-metoxibenceno (101)



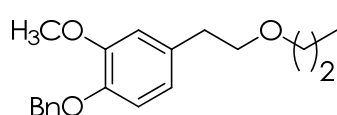
(101)

Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:5. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (86%). **IR:** 3042 ( $\nu_{C_{sp2}-H}$ ), 2927 y 2943 ( $\nu_{C_{sp3}-H}$ ), 1607, 1590 y 1512 ( $\nu_{Ar}$ ), 1230 y 1104 ( $\nu_{C-O}$ )  $cm^{-1}$ .  **$^1H$ -RMN** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 5H, Ph), 6,90 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,86 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,69 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,02 (s, 2H,  $CH_2Ph$  en pos. 6), 3,74 (s, 3H, OMe en pos. 5), 3,52 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,41 (c,



$J = 6,9$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,71 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,08 (t, 3H,  $H_{2'}$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 149,0 ( $C_5$ ), 146,1 ( $C_6$ ), 137,2 ( $C_{\text{ipso}}$ , grupo Bn), 131,9 ( $C_3$ ), 128,3-127,5 ( $C_{2''}$ - $C_{4''}$ , grupo Bn), 120,5 ( $C_8$ ), 113,8 ( $C_7$ ), 113,0 ( $C_4$ ), 70,8 ( $C_1$ ), 70,0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 65,1 ( $C_{1'}$ ), 55,5 (OMe en pos. 5), 35,1 ( $C_2$ ), 15,0 ( $C_{2'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 286 (32%), 195 (5%), 137 (25%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 286,1574 (1,8 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_3$ : C, 75,50; H, 7,74. Encontrado: C, 76,00; H, 7,64.

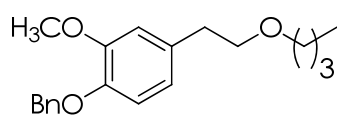
• 1-(Benciloxi)-2-metoxi-4-(2'-propoxietil)benceno (102)



(102)

Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:4. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (83%). **IR**: 3031 ( $\nu_{\text{Csp}2-\text{H}}$ ), 2958 y 2934 ( $\nu_{\text{Csp}3-\text{H}}$ ), 1600, 1590 y 1512 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1232 y 1104 ( $\nu_{\text{C-O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 5H, Ph), 6,90 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,86 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,69 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,02 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,74 (s, 3H, OMe en pos. 5), 3,51 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,32 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,71 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,48 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 0,83 (t, 3H,  $H_{3'}$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 149,0 ( $C_5$ ), 146,1 ( $C_6$ ), 137,2 ( $C_{\text{ipso}}$ , grupo Bn), 131,9 ( $C_3$ ), 128,3-127,5 ( $C_{2''}$ - $C_{4''}$ , grupo Bn), 120,5 ( $C_8$ ), 113,7 ( $C_7$ ), 113,0 ( $C_4$ ), 71,5 ( $C_{1'}$ ), 71,1 ( $C_1$ ), 70,0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 55,5 (OMe en pos. 5), 35,1 ( $C_2$ ), 22,4 ( $C_{2'}$ ), 10,6 ( $C_{3'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 300 (32%), 209 (5%), 137 (52%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 300,1724 (0,5 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_3$ : C, 75,97; H, 8,05. Encontrado: C, 75,97; H, 8,08.

• 1-(Benciloxi)-4-(2'-butoxietil)-2-metoxibenceno (103)

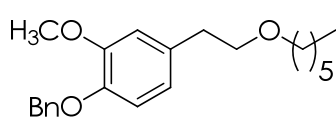


(103)

Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:5. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (76%). **IR**: 3031 ( $\nu_{\text{Csp}2-\text{H}}$ ), 2958 y 2934 ( $\nu_{\text{Csp}3-\text{H}}$ ), 1600, 1590 y 1512 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ),

1227 y 1104 ( $\nu_{C-O}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 5H, Ph), 6,90 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,85 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,69 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,02 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,74 (s, 3H, OMe en pos. 5), 3,51 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 3,36 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,71 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_2'$ ), 1,29 (m, 2H,  $H_{3'}$ ), 0,85 (t, 3H,  $H_4'$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 149,0 ( $C_5$ ), 146,1 ( $C_6$ ), 137,2 ( $C_{\text{ipso}}$ , grupo Bn), 131,9 ( $C_3$ ), 128,3-127,5 ( $C_2''-C_4''$ , grupo Bn), 120,5 ( $C_8$ ), 113,8 ( $C_7$ ), 113,1 ( $C_4$ ), 71,0 ( $C_1$ ), 70,0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 69,5 ( $C_{1'}$ ), 55,5 (OMe en pos. 5), 35,1 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_2'$ ), 18,8 ( $C_3'$ ), 13,6 ( $C_4'$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 314 (29%), 223 (3%), 137 (52%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 314,1881 (0,3 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3$ : C, 76,40; H, 8,33. Encontrado: C, 76,45; H, 8,18.

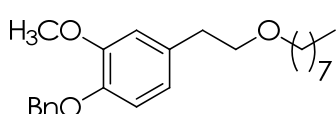
• 1-(Benciloxi)-4-(2'-hexiloxietil)-2-metoxibenceno (104)



(104)

Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:8. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (86%). **IR**: 3053 ( $\nu_{\text{Csp}^2-\text{H}}$ ), 2930 y 2856 ( $\nu_{\text{Csp}^3-\text{H}}$ ), 1606, 1590 y 1512 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1227 y 1106 ( $\nu_{C-O}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 5H, Ph), 6,89 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,85 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,69 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,02 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,74 (s, 3H, OMe en pos. 5), 3,51 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 3,34 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,71 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_2'$ ), 1,23 (m, 6H,  $H_{3'-H_5'}$ ), 0,83 (t, 3H,  $H_6'$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 149,0 ( $C_5$ ), 146,1 ( $C_6$ ), 137,2 ( $C_{\text{ipso}}$ , grupo Bn), 131,9 ( $C_3$ ), 128,3-127,5 ( $C_2-C_4$ , grupo Bn), 120,5 ( $C_8$ ), 113,7 ( $C_7$ ), 113,0 ( $C_4$ ), 71,1 ( $C_1$ ), 70,0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 69,9 ( $C_{1'}$ ), 55,5 (OMe en pos. 5), 35,1 ( $C_2$ ), 29,1 ( $C_2'$ ), 29,1 ( $C_4'$ ), 25,3 ( $C_3'$ ), 22,0 ( $C_5'$ ), 13,8 ( $C_6'$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 342 (24%), 251 (2%), 137 (58%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 342,2190 (1,4 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_3$ : C, 77,16; H, 8,83. Encontrado: C, 77,27; H, 8,95.

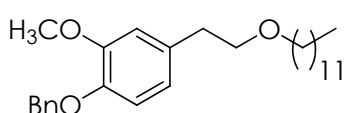
• 1-(Benciloxi)-2-metoxi-4-(2'-octiloxietil)benceno (105)



(105)

Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:8. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (84%). **IR:** 3035 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}2-\text{H}}$ ), 2925 y 2854 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}3-\text{H}}$ ), 1590, 1558 y 1512 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1227 y 1107 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 5H, Ph), 6,89 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,85 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,69 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,02 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,74 (s, 3H, OMe en pos. 5), 3,51 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,34 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,70 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,22 (m, 10H,  $H_{3'-H_7'}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{8'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 149,0 ( $\text{C}_5$ ), 146,1 ( $\text{C}_6$ ), 137,2 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupo Bn), 131,9 ( $\text{C}_3$ ), 128,3-127,5 ( $\text{C}_{2''-\text{C}_{4''}}$ , grupo Bn), 120,5 ( $\text{C}_8$ ), 113,7 ( $\text{C}_7$ ), 113,1 ( $\text{C}_4$ ), 71,0 ( $\text{C}_1$ ), 70,0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 69,8 ( $\text{C}_{1'}$ ), 55,5 (OMe en pos. 5), 35,1 ( $\text{C}_2$ ), 31,1 ( $\text{C}_{6'}$ ), 29,1 ( $\text{C}_{2'}$ ), 28,7 ( $\text{C}_{4'}$ ), 28,6 ( $\text{C}_{5'}$ ), 25,6 ( $\text{C}_{3'}$ ), 22,0 ( $\text{C}_{7'}$ ), 13,8 ( $\text{C}_{8'}$ ); ). **EM** (CI),  $m/z$  (int. relativa): 370 (29%), 279 (2%), 137 (71%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 370,2510 (0,6 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_3$ : C, 77,80; H, 9,25. Encontrado: C, 77,54; H, 9,35.

• 1-(Benciloxi)-4-(2'-dodeciloxietil)-2-metoxibenceno (106)



(106)

Se prepara siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:8. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (64%). **IR:** 3035 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}2-\text{H}}$ ), 2925 y 2854 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}3-\text{H}}$ ), 1590, 1558 y 1512 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1227 y 1107 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 7,37 (m, 5H, Ph), 6,89 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,85 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,68 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,02 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 3,74 (s, 3H, OMe en pos. 5), 3,51 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,34 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,71 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,22 (m, 18H,  $H_{3'-H_{11'}}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{12'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 149,0 ( $\text{C}_5$ ), 146,1 ( $\text{C}_6$ ), 137,2 ( $\text{C}_{\text{ipso}}$ , grupo Bn), 131,9 ( $\text{C}_3$ ), 128,3-127,5 ( $\text{C}_{2''-\text{C}_{4''}}$ , grupo Bn), 120,5 ( $\text{C}_8$ ), 113,8 ( $\text{C}_7$ ), 113,1 ( $\text{C}_4$ ), 71,0 ( $\text{C}_1$ ), 70,0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  en pos. 6), 69,8 ( $\text{C}_{1'}$ ), 55,5 (OMe en pos. 5), 35,1 ( $\text{C}_2$ ), 31,2 ( $\text{C}_{10'}$ ), 29,1 ( $\text{C}_{2'}$ ), 28,9-28,6 ( $\text{C}_{4'-\text{C}_{9'}}$ ), 25,6 ( $\text{C}_{3'}$ ), 22,0 ( $\text{C}_{11'}$ ), 13,8 ( $\text{C}_{12'}$ ). **EM**

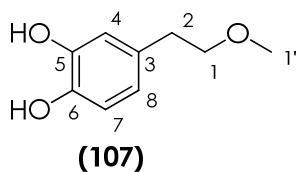
(Cl),  $m/z$  (int. relativa): 426 (24%), 335 (2%), 137 (65%), 91 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 426,3148 (3,3 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $C_{28}H_{42}O_3$ : C, 78,83; H, 9,92. Encontrado: C, 78,73; H, 9,59.

#### 4.3.2. Reacción de hidrogenolisis. Procedimiento general

El correspondiente éter protegido (1mmol) se disuelve en THF destilado (20mL), y se añade un 10% (p/p) de carbón-paladio (C-Pd) como catalizador. La mezcla se hidrogena a una presión de 4bar con agitación magnética a temperatura ambiente durante 24 horas. El fin de la reacción se confirma mediante cromatografía en capa fina (ccf). Se filtra y lava el catalizador a través de celita, se evapora el disolvente a vacío y el producto obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

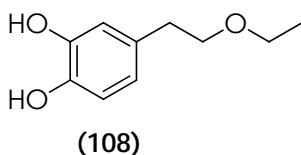
##### 4.3.2.1. Reacción de hidrogenolisis de los alquil dibencil derivados de hidroxitirosol

- 4-(2'-metoxietil)benceno-1,2-diol (107)



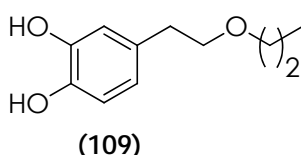
Se prepara a partir de **83** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:1. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (96%). **IR**: 3307 ( $\nu_{OH}$ ), 2932 ( $\nu_{C_{sp^3-H}}$ ), 1605, 1520 y 1446 ( $\nu_{Ar}$ ), 1279 y 1113 ( $\nu_{C-O}$ )  $cm^{-1}$ .  **$^1H$ -RMN** (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 8,62 (s, 2H, OH en pos. 5 y 6), 6,60 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,58 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,43 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,42 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,21 (s, 3H,  $H_{1'}$ ), 2,60 (t, 2H,  $H_2$ ).  **$^{13}C$ -RMN** (125 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 144,9 ( $C_5$ ), 143,4 ( $C_6$ ), 129,7 ( $C_3$ ), 119,3 ( $C_8$ ), 116,2 ( $C_4$ ), 115,3 ( $C_7$ ), 73,2 ( $C_1$ ), 57,7 ( $C_{1'}$ ), 35,0 ( $C_2$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 168 (49%), 123 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 168,0792 (3,6 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $C_9H_{12}O_3$ : C, 64,27; H, 7,19. Encontrado: C, 63,74; H, 6,94.

• 4-(2'-etoxietil)benceno-1,2-diol (108)



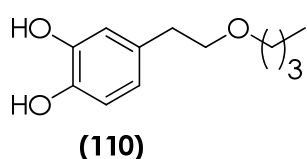
Se prepara a partir de **84** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:2. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (88%). **IR:** 3303 ( $\nu_{OH}$ ), 2975 ( $\nu_{C_{sp^3-H}}$ ), 1605, 1520 y 1475 ( $\nu_{Ar}$ ), 1280 y 1112 ( $\nu_{C-O}$ )  $cm^{-1}$ .  **$^1H$ -RMN** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,65 (s, 2H, OH en pos. 5 y 6), 6,60 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,58 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,44 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,45 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,40 (c,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,59 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,08 (t, 3H,  $H_{2'}$ ).  **$^{13}C$ -RMN** (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 144,9 ( $C_5$ ), 143,2 ( $C_6$ ), 129,7 ( $C_3$ ), 119,3 ( $C_8$ ), 116,2 ( $C_4$ ), 115,3 ( $C_7$ ), 71,1 ( $C_1$ ), 65,1 ( $C_{1'}$ ), 35,0 ( $C_2$ ), 15,0 ( $C_{2'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 182 (49%), 123 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 182,0943 (0,5 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $C_{10}H_{14}O_3$ : C, 65,91; H, 7,74. Encontrado: C, 65,39; H, 7,44.

• 4-(2'-propoxietil)benceno-1,2-diol (109)



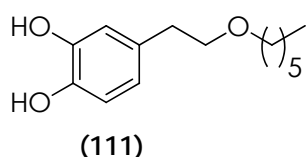
Se prepara a partir de **85** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:5. Se obtiene el producto puro como un sólido blanco (91%). **P.f.:** 92-94°C. **IR:** 3276 ( $\nu_{OH}$ ), 2928 y 2871 ( $\nu_{C_{sp^3-H}}$ ), 1613, 1530 y 1445 ( $\nu_{Ar}$ ), 1290 y 1254 ( $\nu_{C-O}$ )  $cm^{-1}$ .  **$^1H$ -RMN** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,69 (s, 2H, OH en pos. 5 y 6), 6,60 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,58 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,44 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,45 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,31 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,60 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,48 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 0,83 (t, 3H,  $H_{3'}$ ).  **$^{13}C$ -RMN** (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 144,9 ( $C_5$ ), 143,3 ( $C_6$ ), 129,7 ( $C_3$ ), 119,3 ( $C_8$ ), 116,2 ( $C_4$ ), 115,3 ( $C_7$ ), 71,5 ( $C_{1'}$ ), 71,3 ( $C_1$ ), 35,0 ( $C_2$ ), 22,4 ( $C_{2'}$ ), 10,5 ( $C_{3'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 196 (36%), 123 (100%), 91 (6%). **EM-AR**  $m/z$ : 196,1093 (2,8 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $C_{11}H_{16}O_3 \cdot \frac{1}{3}H_2O$ : C, 65,32; H, 8,31. Encontrado: C, 65,29; H, 7,76.

• 4-(2'-butiloxietil)benceno-1,2-diol (110)



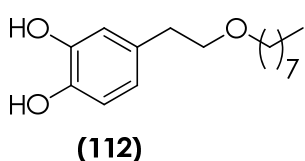
Se prepara a partir de **86** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:5. Se obtiene el producto puro como un sólido blanco (98%). **P.f.** 66–68°C. **IR:** 3290 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2930 y 2864 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1612, 1530 y 1473 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1287 y 1093 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,62 (s, 1H, OH en pos. 6), 8,56 (s, 1H, OH en pos. 5), 6,60 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,58 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,44 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,45 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,34 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,59 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,29 (m, 2H,  $H_{3'}$ ), 0,85 (t, 3H,  $H_{4'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 144,8 ( $C_5$ ), 143,3 ( $C_6$ ), 129,7 ( $C_3$ ), 119,3 ( $C_8$ ), 116,2 ( $C_4$ ), 115,3 ( $C_7$ ), 71,4 ( $C_1$ ), 69,6 ( $C_{1'}$ ), 35,0 ( $C_2$ ), 31,3 ( $C_{2'}$ ), 18,8 ( $C_{3'}$ ), 13,7 ( $C_{4'}$ ). **EM** (CI),  $m/z$  (int. relativa): 210 (39%), 149 (6%), 123 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 210,1252 (1,5 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_3$ : C, 68,54; H, 8,63. Encontrado: C, 68,09; H, 8,54.

• 4-(2'-hexiloxietil)benceno-1,2-diol (111)



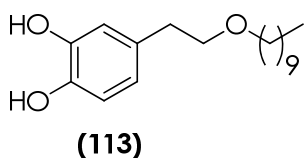
Se prepara a partir de **87** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:5. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (91%). **IR:** 3290 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2930 y 2858 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1605, 1519 y 1466 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1278 y 1112 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,65 (s, 2H, OH en pos. 5 y 6), 6,60 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,58 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,44 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,45 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,34 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,59 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,24 (m, 6H,  $H_{3'-H_{5'}}$ ), 0,85 (t, 3H,  $H_{6'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 144,9 ( $C_5$ ), 143,3 ( $C_6$ ), 129,7 ( $C_3$ ), 119,3 ( $C_8$ ), 116,2 ( $C_4$ ), 115,3 ( $C_7$ ), 71,4 ( $C_1$ ), 69,9 ( $C_{1'}$ ), 35,0 ( $C_2$ ), 31,0 ( $C_{4'}$ ), 29,1 ( $C_{2'}$ ), 25,3 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{5'}$ ), 13,8 ( $C_{6'}$ ). **EM** (CI),  $m/z$  (int. relativa): 238 (36%), 137 (11%), 123 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 238,1577 (3,7 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_3 \times \frac{1}{3} \text{H}_2\text{O}$ : C, 68,82; H, 9,35. Encontrado: C, 69,22; H, 8,88.

• 4-(2'-octiloxietil)benzeno-1,2-diol (112)



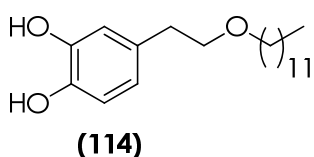
Se prepara a partir de **88** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:8. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (83%). **IR:** 3394 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2927 y 2856 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1606, 1519 y 1466 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1266 y 1110 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,59 (s, 2H, OH en pos. 5 y 6), 6,60 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,58 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,43 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,44 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,33 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,59 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,23 (m, 10H,  $H_{3'}$ - $H_{7'}$ ), 0,85 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H,  $H_{8'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 144,8 ( $C_5$ ), 143,3 ( $C_6$ ), 129,7 ( $C_3$ ), 119,3 ( $C_8$ ), 116,1 ( $C_4$ ), 115,3 ( $C_7$ ), 71,4 ( $C_1$ ), 69,9 ( $C_{1'}$ ), 35,0 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{6'}$ ), 29,1 ( $C_{2'}$ ), 28,7 ( $C_{4'}$ ), 28,6 ( $C_{5'}$ ), 25,6 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{7'}$ ), 13,8 ( $C_{8'}$ ). **EM** (CI),  $m/z$  (int. relativa): 266 (64%), 137 (16%), 123 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 266,1880 (0,7 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_3$ : C, 72,14; H, 9,84. Encontrado: C, 72,31; H, 10,05.

• 4-(2'-deciloxietil)benzeno-1,2-diol (113)



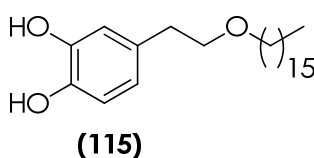
Se prepara a partir de **89** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla acetato de etilo/hexano 1:8. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (83%). **IR:** 3359 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2922 y 2853 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1605, 1519 y 1444 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1277 y 1110 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,63 (s, 1H, OH en pos. 6), 8,56 (s, 1H, OH en pos. 5), 6,59 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,57 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,43 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,44 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,33 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,58 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,41 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,24 (m, 10H,  $H_{3'}$ - $H_{9'}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{10'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 144,8 ( $C_5$ ), 143,3 ( $C_6$ ), 129,7 ( $C_3$ ), 119,3 ( $C_8$ ), 116,1 ( $C_4$ ), 115,3 ( $C_7$ ), 71,4 ( $C_1$ ), 69,9 ( $C_{1'}$ ), 34,9 ( $C_2$ ), 29,1 ( $C_{2'}$ ), 29,0-28,6 ( $C_{4'}$ - $C_{7'}$ ), 25,6 ( $C_{3'}$ ), 31,2 ( $C_{8'}$ ), 22,0 ( $C_{9'}$ ), 13,8 ( $C_{10'}$ ). **EM** (CI),  $m/z$  (int. relativa): 294 (54%), 123 (100%), 71 (32%). **EM-AR**  $m/z$ : 294,2194 (0,3 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3$ : C, 73,43; H, 10,27. Encontrado: C, 73,41; H, 10,39.

• 4-(2'-dodeciloxietil)benceno-1,2-diol (114)



Se prepara a partir de **90** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:12. Se obtiene el producto puro como un sólido blanco (82%). **P.f.:** 39–41°C. **IR:** 3460 y 3325 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2918 y 2851 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1600, 1521 y 1470 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1273 y 1116 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,63 (s, 1H, OH en pos. 6), 8,56 (s, 1H, OH en pos. 5), 6,60 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,57 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,43 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,44 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,33 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,59 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,23 (m, 18H,  $H_{3'}-H_{11'}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{12'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 144,8 ( $C_5$ ), 143,3 ( $C_6$ ), 129,7 ( $C_3$ ), 119,3 ( $C_8$ ), 116,1 ( $C_4$ ), 115,3 ( $C_7$ ), 71,4 ( $C_1$ ), 69,9 ( $C_{1'}$ ), 35,0 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{10'}$ ), 29,1 ( $C_{2'}$ ), 28,9–28,6 ( $C_{4'}-C_{9'}$ ), 25,6 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{11'}$ ), 13,8 ( $C_{12'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 322 (93%), 154 (5%), 137 (27%), 123 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 322,2502 (1,7 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$ : C, 74,49; H, 10,63. Encontrado: C, 74,11; H, 10,64.

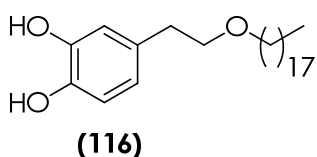
• 4-(2'-hexadeciloxietil)benceno-1,2-diol (115)



Se prepara a partir de **91** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla acetato de etilo/hexano 1:7. Se obtiene el producto puro como un sólido blanco (83%). **P.f.:** 54–56°C. **IR:** 3442 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2954 y 2847 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1612, 1529 y 1458 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1285 y 1110 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,59 (s, 2H, OH en pos. 5 y 6), 6,60 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,58 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,43 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,44 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,33 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,59 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,23 (m, 10H,  $H_{3'}-H_{15'}$ ), 0,85 (t, 3H,  $H_{16'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 144,8 ( $C_5$ ), 143,3 ( $C_6$ ), 129,7 ( $C_3$ ), 119,3 ( $C_8$ ), 116,1 ( $C_4$ ), 115,3 ( $C_7$ ), 71,4 ( $C_1$ ), 69,9 ( $C_{1'}$ ), 35,0 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{14'}$ ), 29,1 ( $C_{2'}$ ), 29,0–28,6 ( $C_{4'}-C_{13'}$ ), 25,6 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{15'}$ ), 13,8 ( $C_{16'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 378 (57%), 137 (38%), 123 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 378,3134 (0,0 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_3$ : C, 76,14; H, 11,18. Encontrado: C, 76,41; H, 10,71.



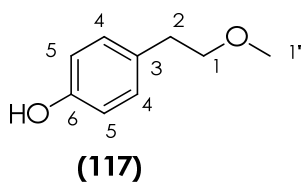
• 4-(2'-octadeciloxietil)benceno-1,2-diol (116)



Se prepara a partir de **92** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:12. Se obtiene el producto puro como un sólido blanco (98%). **P.f.:** 65–67°C. **IR:** 3394 ( $\nu_{OH}$ ), 2927 y 2856 ( $\nu_{C_{sp^3-H}}$ ), 1606, 1519 y 1466 ( $\nu_{Ar}$ ), 1266 y 1110 ( $\nu_{C-O}$ )  $cm^{-1}$ . **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,63 (s, 1H, OH en pos. 6), 8,56 (s, 1H, OH en pos. 5), 6,60 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,57 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,43 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,44 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,33 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,59 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,23 (m, 30H,  $H_{3'-H_{17'}}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{18'}$ ). **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 144,9 ( $C_5$ ), 143,3 ( $C_6$ ), 129,7 ( $C_3$ ), 119,3 ( $C_8$ ), 116,1 ( $C_4$ ), 115,3 ( $C_7$ ), 71,4 ( $C_1$ ), 69,9 ( $C_{1'}$ ), 35,0 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{16'}$ ), 29,2 ( $C_{2'}$ ), 29,0–28,6 ( $C_{4'-C_{15'}}$ ), 25,6 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{17'}$ ), 13,8 ( $C_{18'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 406 (64%), 137 (16%), 123 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 406,3443 (1.0 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $C_{26}H_{46}O_3 \times \frac{1}{3} H_2O$ : C, 75,68; H, 11,40. Encontrado: C, 75,77; H, 12,20.

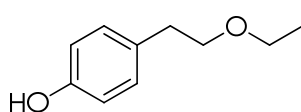
4.3.2.2. Reacción de hidrogenolisis de los alquil bencil derivados de tirosol

• 4-(2'-metoxietil)fenol (117)



Se prepara a partir de **93** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:5. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (82%). **IR:** 3373 ( $\nu_{OH}$ ), 2979 y 2866 ( $\nu_{C_{sp^3-H}}$ ), 1614, 1515 y 1465 ( $\nu_{Ar}$ ), 1230 y 1106 ( $\nu_{C-O}$ )  $cm^{-1}$ . **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 9,09 (s, 1H, OH en pos. 6), 6,98 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 6,64 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H,  $H_4$ ), 3,44 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,21 (s, 3H,  $H_{1'}$ ), 2,66 (t, 2H,  $H_2$ ). **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 155,4 ( $C_6$ ), 129,5 ( $C_4$ ), 128,9 ( $C_3$ ), 114,9 ( $C_5$ ), 73,1 ( $C_1$ ), 57,6 ( $C_{1'}$ ), 34,4 ( $C_2$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 152 (88%), 107 (100%), 77 (18%). **EM-AR**  $m/z$ : 152,0828 (6,1 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $C_9H_{12}O_2$ : C, 71,03; H, 7,95. Encontrado: C, 71,14; H, 7,60.

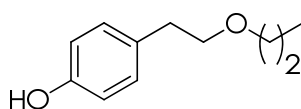
• 4-(2'-etoxietil)fenol (118)



(118)

Se prepara a partir de **94** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:5. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (81%). **IR:** 3373 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2979 y 2866 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1614, 1515 y 1465 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1230 y 1106 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 9,11 (s, 1H, OH en pos. 6), 6,99 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 6,64 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H,  $H_4$ ), 3,46 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,39 (c,  $J = 6,9$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,65 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,07 (t, 3H,  $H_{2'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 155,4 ( $C_6$ ), 129,5 ( $C_4$ ), 128,9 ( $C_3$ ), 114,9 ( $C_5$ ), 71,1 ( $C_1$ ), 65,1 ( $C_{1'}$ ), 34,7 ( $C_2$ ), 15,0 ( $C_{2'}$ ). **EM (CI)**,  $m/z$  (int. relativa): 166 (23%), 107 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 166,0992 (1,1 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$ : C, 72,26; H, 8,49. Encontrado: C, 72,16; H, 8,13.

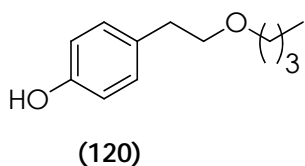
• 4-(2'-propoxietil)fenol (119)



(119)

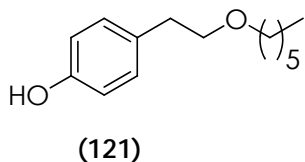
Se prepara a partir de **95** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:5. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (87%). **IR:** 3390 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2936 y 2871 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1614, 1515 y 1446 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1229 y 1088 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 9,09 (s, 1H, OH pos. 6), 6,99 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 6,64 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H,  $H_4$ ), 3,47 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,30 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,66 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,47 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 0,82 (t, 3H,  $H_{3'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 155,4 ( $C_6$ ), 129,5 ( $C_4$ ), 128,9 ( $C_3$ ), 114,9 ( $C_5$ ), 71,4 ( $C_{1'}$ ), 71,3 ( $C_1$ ), 34,7 ( $C_2$ ), 22,3 ( $C_{2'}$ ), 10,4 ( $C_{3'}$ ). **EM (CI)**,  $m/z$  (int. relativa): 180 (28%), 162 (23%), 107 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 180,1152 (0,9 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$ : C, 73,30; H, 8,95. Encontrado: C, 72,91; H, 8,96.

• 4-(2'-butoxi)etilfenol (120)



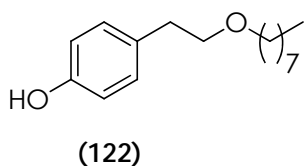
Se prepara a partir de **96** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:5. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (86%). **IR:** 3433 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2959 y 2866 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1617, 1515 y 1382 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1232 y 1091 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 9,09 (s, 1H, OH pos. 6), 6,99 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 6,64 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H,  $H_4$ ), 3,46 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,34 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,65 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,44 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,28 (m, 2H,  $H_{3'}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{4'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 155,4 ( $C_6$ ), 129,5 ( $C_4$ ), 128,9 ( $C_3$ ), 114,9 ( $C_5$ ), 71,3 ( $C_1$ ), 69,5 ( $C_{1'}$ ), 34,7 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{2'}$ ), 18,8 ( $C_{3'}$ ), 13,7 ( $C_{4'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 194 (57%), 107 (100%), 57 (45%). **EM-AR**  $m/z$ : 194,1294 (6,6 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_2$ : C, 74,29; H, 9,34. Encontrado: C, 74,24; H, 9,38.

• 4-(2'-hexiloxi)etilfenol (121)



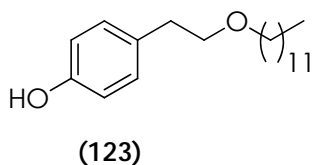
Se prepara a partir de **97** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:9. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (85%). **IR:** 3397 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2931 y 2858 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1614, 1515 y 1451 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1231 y 1092 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 9,08 (s, 1H, OH pos. 6), 6,98 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 6,64 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H,  $H_4$ ), 3,46 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,33 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,65 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,44 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,23 (m, 6H,  $H_{3'-H_5'}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{6'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 155,4 ( $C_6$ ), 129,5 ( $C_4$ ), 128,9 ( $C_3$ ), 114,9 ( $C_5$ ), 71,3 ( $C_1$ ), 69,8 ( $C_{1'}$ ), 34,7 ( $C_2$ ), 31,0 ( $C_{4'}$ ), 29,1 ( $C_{2'}$ ), 25,3 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{5'}$ ), 13,8 ( $C_{6'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 222 (32%), 107 (100%), 85 (48%). **EM-AR**  $m/z$ : 222,1623 (1,4 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2$ : C, 75,63; H, 9,97. Encontrado: C, 75,80; H, 10,28.

• 4-(2'-octiloxietil)fenol (122)



Se prepara a partir de **98** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:10. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (85%). **IR:** 3397 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2929 y 2857 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1615, 1519 y 1455 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1232 y 1093 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 9,08 (s, 1H, OH pos. 6), 6,98 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 6,64 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H,  $H_4$ ), 3,46 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,33 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,65 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,44 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,22 (m, 10H,  $H_{3'-H_{7'}}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_8$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 155,4 ( $C_6$ ), 129,5 ( $C_4$ ), 128,9 ( $C_3$ ), 114,9 ( $C_5$ ), 71,3 ( $C_1$ ), 69,8 ( $C_{1'}$ ), 34,7 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{6'}$ ), 29,1 ( $C_{2'}$ ), 28,7 ( $C_{4'}$ ), 28,6 ( $C_{5'}$ ), 25,6 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{7'}$ ) 13,8 ( $C_{8'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 250 (49%), 107 (100%), 71 (36%). **EM-AR**  $m/z$ : 250,1926 (2,7 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_2$ : C, 76,75; H, 10,47 Encontrado: C, 76,45; H, 10,42.

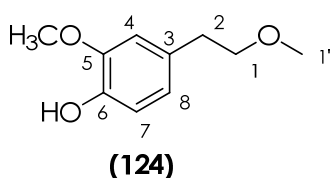
• 4-(2'-dodeciloxietil)fenol (123)



Se prepara a partir de **99** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:10. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (89%). **IR:** 3419 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2918 y 2852 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1615, 1515 y 1467 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1256 y 1111 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 9,08 (s, 1H, OH pos. 6), 6,97 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 6,64 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H,  $H_4$ ), 3,45 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,32 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,65 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,44 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,22 (m, 18H,  $H_{3'-H_{11'}}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{12'}$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 155,4 ( $C_6$ ), 129,5 ( $C_4$ ), 128,9 ( $C_3$ ), 114,8 ( $C_5$ ), 71,3 ( $C_1$ ), 69,8 ( $C_{1'}$ ), 34,7 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{10'}$ ), 29,1 ( $C_{2'}$ ), 28,9-28,6 ( $C_{4'-C_{9'}}$ ), 25,6 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{11'}$ ) 13,8 ( $C_{12'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 306 (38%), 107 (100%), 71 (42%). **EM-AR**  $m/z$ : 306,2546 (4,2 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$ : C, 78,38; H, 11,18. Encontrado: C, 77,99; H, 11,02.

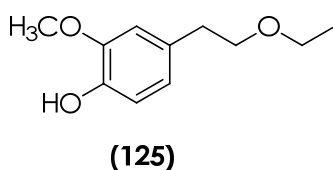
#### 4.3.2.3. Reacción de hidrogenólisis de los alquil bencil derivados de alcohol homovanílico

- 2-metoxi-4-(2'-metoxietil)fenol (124)



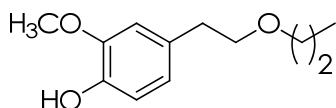
Se prepara a partir de **100** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:3. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (78%). **IR:** 3444 ( $\nu_{OH}$ ), 2937 y 2829 ( $\nu_{C_{sp^3-H}}$ ), 1613, 1600 y 1516 ( $\nu_{Ar}$ ), 1227 y 1111 ( $\nu_{C-O}$ )  $cm^{-1}$ .  **$^1H$ -RMN** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,63 (s, 1H, OH pos. 6), 6,76 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,65 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,58 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,72 (s, 3H, OMe en pos. 5), 3,46 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,22 (s, 3H,  $H_{1'}$ ), 2,68 (t, 2H,  $H_2$ ).  **$^{13}C$ -RMN** (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 147,2 ( $C_5$ ), 144,7 ( $C_6$ ), 129,6 ( $C_3$ ), 120,8 ( $C_8$ ), 115,2 ( $C_7$ ), 113,0 ( $C_4$ ), 73,1 ( $C_1$ ), 57,7 ( $C_{1'}$ ), 55,5 (OMe en pos. 5), 34,9 ( $C_2$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 182 (23%), 137 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 182,0949 (3,3 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $C_{10}H_{14}O_3$ : C, 65,91; H, 7,74. Encontrado: C, 66,33; H, 8,05.

- 4-(2'-etoxietil)-2-metoxifenol (125)



Se prepara a partir de **101** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:3. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (80%). **IR:** 3430 ( $\nu_{OH}$ ), 2938 y 2840 ( $\nu_{C_{sp^3-H}}$ ), 1603, 1514 y 1462 ( $\nu_{Ar}$ ), 1227 y 1111 ( $\nu_{C-O}$ )  $cm^{-1}$ .  **$^1H$ -RMN** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,62 (s, 1H, OH pos. 6), 6,77 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,65 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,58 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,72 (s, 3H, OMe en pos. 5), 3,49 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,41 (c,  $J = 7,0$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,67 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,08 (t, 3H,  $H_{2'}$ ).  **$^{13}C$ -RMN** (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 147,2 ( $C_5$ ), 144,7 ( $C_6$ ), 129,6 ( $C_3$ ), 120,8 ( $C_8$ ), 115,2 ( $C_7$ ), 113,0 ( $C_4$ ), 71,0 ( $C_1$ ), 65,1 ( $C_{1'}$ ), 55,5 (OMe en pos. 5), 35,1 ( $C_2$ ), 15,0 ( $C_{2'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 196 (24%), 137 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 196,1106 (3,3 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $C_{11}H_{16}O_3$ : C, 67,32; H, 8,22. Encontrado: C, 67,21; H, 8,30.

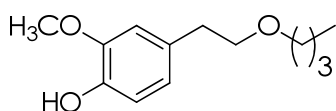
• 2-metoxi-4-(2'-propoxietil)fenol (126)



(126)

Se prepara a partir de **102** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:5. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (83%). **IR**: 3442 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2970 y 2936 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1613, 1600 y 1516 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1232 y 1122 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,66 (s, 1H, OH pos. 6), 6,78 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,64 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,58 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,72 (s, 3H, OMe en pos. 5), 3,49 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,31 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,67 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,48 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_3$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 147,2 ( $C_5$ ), 144,7 ( $C_6$ ), 129,6 ( $C_3$ ), 120,9 ( $C_8$ ), 115, ( $C_7$ ), 113,0 ( $C_4$ ), 71,5 ( $C_{1'}$ ), 71,3 ( $C_1$ ), 55,5 (OMe en pos. 5), 35,2 ( $C_2$ ), 22,5 ( $C_{2'}$ ), 10,4 ( $C_3$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 210 (14%), 137 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 210,1252 (1,9 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_3$ : C, 68,54; H, 8,63. Encontrado: C, 68,35; H, 8,65.

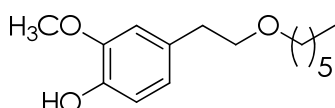
• 4-(2'-butoxietil)-2-metoxifenol (127)



(127)

Se prepara a partir de **103** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:5. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (81%). **IR**: 3436 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2953 y 2869 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1612, 1590 y 1515 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1232 y 1122 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,62 (s, 1H, OH pos. 6), 6,77 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,65 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,58 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,72 (s, 3H, OMe en pos. 5), 3,49 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,35 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,67 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,29 (m, 2H,  $H_3$ ), 0,85 (t, 3H,  $H_4$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 147,2 ( $C_5$ ), 144,7 ( $C_6$ ), 129,6 ( $C_3$ ), 120,8 ( $C_8$ ), 115,1 ( $C_7$ ), 113,0 ( $C_4$ ), 71,2 ( $C_1$ ), 69,5 ( $C_{1'}$ ), 55,4 (OMe en pos. 5), 35,1 ( $C_2$ ), 31,3 ( $C_{2'}$ ), 18,8 ( $C_{3'}$ ), 13,7 ( $C_{4'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 224 (22%), 137 (100%), 57 (39%). **EM-AR**  $m/z$ : 224,1418 (2,5 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ : C, 69,61; H, 8,99. Encontrado: C, 69,04; H, 9,30.

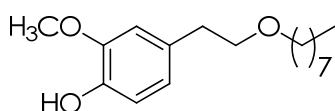
• 4-(2'-hexiloxietil)-2-metoxifenol (128)



(128)

Se prepara a partir de **104** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:7. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (86%). **IR:** 3435 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2932 y 2857 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1610, 1605 y 1516 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1230 y 1107 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,61 (s, 1H, OH pos. 6), 6,77 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,64 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,58 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,72 (s, 3H, OMe en pos. 5), 3,49 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,34 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,66 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,46 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,24 (m, 6H,  $H_{3'-H_5'}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_4'$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 147,2 ( $C_5$ ), 144,7 ( $C_6$ ), 129,6 ( $C_3$ ), 120,8 ( $C_8$ ), 115,1 ( $C_7$ ), 113,0 ( $C_4$ ), 71,2 ( $C_1$ ), 69,2 ( $C_{1'}$ ), 55,4 (OMe en pos. 5), 35,1 ( $C_2$ ), 29,1 ( $C_{2'}$ ), 29,1 ( $C_{4'}$ ), 25,3 ( $C_{3'}$ ), 22,1 ( $C_{5'}$ ), 13,8 ( $C_{6'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 252 (47%), 137 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 252,1725 (0,2 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3$ : C, 71,39; H, 9,59. Encontrado: C, 71,33; H, 9,59.

• 2-metoxi-4-(2'-octiloxietil)fenol (129)

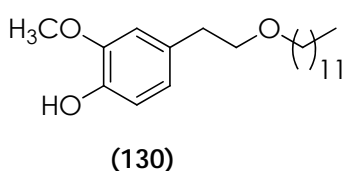


(129)

Se prepara a partir de **105** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:7. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (79%). **IR:** 3453 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 2930 y 2856 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$ ), 1620, 1613 y 1516 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1229 y 1108 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .  **$^1\text{H-RMN}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,65 (s, 1H, OH pos. 6), 6,77 (d,  $J = 1,7$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,64 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,57 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,72 (s, 3H, OMe en pos. 5), 3,48 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,34 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,66 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,22 (m, 10H,  $H_{3'-H_7'}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_8'$ ).  **$^{13}\text{C-RMN}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 147,2 ( $C_5$ ), 144,7 ( $C_6$ ), 129,6 ( $C_3$ ), 120,8 ( $C_8$ ), 115,1 ( $C_7$ ), 112,9 ( $C_4$ ), 71,3 ( $C_1$ ), 69,9 ( $C_{1'}$ ), 55,4 (OMe en pos. 5), 35,1 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{6'}$ ), 29,2 ( $C_{2'}$ ), 28,7 ( $C_{4'}$ ), 28,6 ( $C_{5'}$ ), 25,7 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{7'}$ ), 13,8 ( $C_{8'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 280

(32%), 137 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 280,2033 (1,9 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $C_{17}H_{28}O_3$ : C, 72,82; H, 10,06. Encontrado: C, 72,78; H, 10,03.

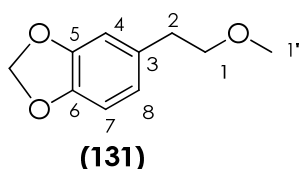
• 4-(2'-dodeciloxietil)-2-metoxifenol (130)



Se prepara a partir de **106** siguiendo el procedimiento general usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:8. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (72%). **IR**: 3450 ( $\nu_{OH}$ ), 2923 y 2853 ( $\nu_{C_{sp^3-H}}$ ), 1620, 1615 y 1516 ( $\nu_{Ar}$ ), 1228 y 1152 y 1036 ( $\nu_{C-O}$ )  $cm^{-1}$ .  **$^1H$ -RMN** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,62 (s, 1H, OH pos. 6), 6,77 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,64 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,57 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3,72 (s, 3H, OMe en pos. 5), 3,48 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,34 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2,66 (t, 2H,  $H_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1,22 (m, 18H,  $H_{3'-H_{11'}}$ ), 0,84 (t, 3H,  $H_{12'}$ ).  **$^{13}C$ -RMN** (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 147,2 ( $C_5$ ), 144,7 ( $C_6$ ), 129,6 ( $C_3$ ), 120,8 ( $C_8$ ), 115,1 ( $C_7$ ), 113,0 ( $C_4$ ), 71,2 ( $C_1$ ), 69,8 ( $C_{1'}$ ), 55,4 (OMe en pos. 5), 35,1 ( $C_2$ ), 31,2 ( $C_{10'}$ ), 29,1 ( $C_{2'}$ ), 28,9-28,6 ( $C_{4'-C_{9'}}$ ), 25,6 ( $C_{3'}$ ), 22,0 ( $C_{11'}$ ), 13,8 ( $C_{12'}$ ). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 336 (45%), 151 (41%), 137 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 336,2669 (1,4 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para  $C_{21}H_{36}O_3$ : C, 74,95; H, 10,98. Encontrado: C, 74,92; H, 10,76.

**4.3.3. Reacción de alquilación de 2-(3',4'-dioximetilidén)feniletanol (82)**

• 1,2-(dioximetilidén)-4-(2'-metoxietil)benceno (131)

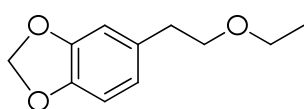


Se prepara siguiendo el procedimiento general (Apartado 4.3.1.) usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:12. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (80%). **IR**: 3035 ( $\nu_{C_{sp^2-H}}$ ), 2916 y 2847 ( $\nu_{C_{sp^3-H}}$ ), 1504, 1487 y 1442 ( $\nu_{Ar}$ ), 1244 y 1109 ( $\nu_{C-O}$ )  $cm^{-1}$ .  **$^1H$ -RMN** (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 6,79 (d,  $J_{4,8} = 1,8$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6,78 (d,  $J_{7,8} = 7,9$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6,66 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5,94 (s, 2H, O- $CH_2$ -O), 3,46 (t,  $J_{1,2} = 6,8$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 3,21 (s, 3H,  $H_{1'}$ ), 2,70 (t, 2H,  $H_2$ ).  **$^{13}C$ -RMN** (125 MHz,



DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 147,2 (C<sub>5</sub>), 144,7 (C<sub>6</sub>), 129,6 (C<sub>3</sub>), 121,5 (C<sub>8</sub>), 109,1 (C<sub>4</sub>), 107,9 (C<sub>7</sub>), 100,5 (C, O-CH<sub>2</sub>-O), 72,8 (C<sub>1</sub>), 57,7 (C<sub>1'</sub>), 34,9 (C<sub>2</sub>). **EM** (Cl), *m/z* (int. relativa): 180 (33%), 135 (100%), 77 (12%). **EM-AR** *m/z*: 180,0797 (5,9 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>: C, 66,65; H, 6,71. Encontrado: C, 66,65; H, 6,67.

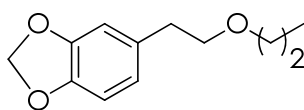
• 1,2-(dioximetilidén)-4-(2'-etoxietil)benceno (132)



(132)

Se prepara siguiendo el procedimiento general (Apartado 4.3.1.) usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:15. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (81%). **IR**: 3027 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}2-\text{H}}$ ), 2974 y 2868 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}3-\text{H}}$ ), 1504, 1486 y 1440 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1242 y 1103 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ . **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 6,80 (d,  $J_{4,8} = 1,6$  Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6,78 (d,  $J_{7,8} = 7,8$  Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6,66 (dd, 1H, H<sub>8</sub>), 5,94 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O), 3,49 (t,  $J_{1,2} = 6,0$  Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 3,40 (c,  $J = 7,0$  Hz, 2H, H<sub>1'</sub>), 2,69 (t, 2H, H<sub>2</sub>), 1,07 (t, H<sub>2'</sub>). **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 147,2 (C<sub>5</sub>), 144,7 (C<sub>6</sub>), 129,6 (C<sub>3</sub>), 121,5 (C<sub>8</sub>), 109,1 (C<sub>4</sub>), 107,9 (C<sub>7</sub>), 100,5 (C metileno), 70,8 (C<sub>1</sub>), 65,1 (C<sub>1'</sub>), 35,2 (C<sub>2</sub>), 15,0 (C<sub>2'</sub>). **EM** (Cl), *m/z* (int. relativa): 194 (38%), 135 (100%), 77 (11%). **EM-AR** *m/z*: 194,0958 (7,8 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>: C, 68,02; H, 7,27. Encontrado: C, 68,35; H, 7,57.

• 1,2-(dioximetilidén)-4-(2'-propoxietil)benceno (133)

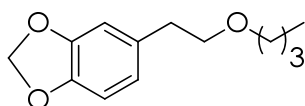


(133)

Se prepara siguiendo el procedimiento general (Apartado 4.3.1.) usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:35. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (70%). **IR**: 3027 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}2-\text{H}}$ ), 2974 y 2868 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}3-\text{H}}$ ), 1504, 1486 y 1440 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1242 y 1103 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ . **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 6,80 (d,  $J_{4,8} = 1,7$  Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6,78 (d,  $J_{7,8} = 7,9$  Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6,66 (dd, 1H, H<sub>8</sub>), 5,93 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O), 3,49 (t,  $J_{1,2} = 7,0$  Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 3,31 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H, H<sub>1'</sub>), 2,70 (t, 2H, H<sub>2</sub>), 1,47 (m, 2H, H<sub>2'</sub>), 0,82 (t, 3H, H<sub>3'</sub>). **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 147,2 (C<sub>5</sub>), 144,7 (C<sub>6</sub>), 129,6 (C<sub>3</sub>), 121,5 (C<sub>8</sub>), 109,1 (C<sub>4</sub>), 107,8 (C<sub>7</sub>), 100,5 (C metileno), 71,5 (C<sub>1</sub>),

71,0 (C<sub>1</sub>), 35,1 (C<sub>2</sub>), 22,3 (C<sub>2'</sub>), 10,5 (C<sub>3'</sub>). **EM** (CI), *m/z* (int. relativa): 208 (23%), 135 (100%), 57 (18%). **EM-AR** *m/z*: 208,1095 (2,1 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>: C, 69,21; H, 7,74. Encontrado: C, 69,30; H, 7,62.

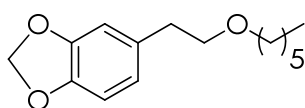
• 4-(2'-butoxietil)-1,2-(dioximetilidén)benceno (134)



(134)

Se prepara siguiendo el procedimiento general (Apartado 4.3.1.) usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:40. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (70%). **IR**: 3053 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}2-\text{H}}$ ), 2958 y 2868 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}3-\text{H}}$ ), 1504, 1487 y 1441 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1249 y 1102 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ . **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 6,80 (d,  $J_{4,8} = 1,7$  Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6,78 (d,  $J_{7,8} = 7,9$  Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6,66 (dd, 1H, H<sub>8</sub>), 5,93 (s, 2H, metileno), 3,48 (t,  $J_{1,2} = 6,9$  Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 3,34 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H, H<sub>1'</sub>), 2,69 (t, 2H, H<sub>2</sub>), 1,44 (m, 2H, H<sub>2'</sub>), 1,28 (m, 2H, H<sub>3'</sub>), 0,84 (t, 3H, H<sub>4'</sub>). **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 147,2 (C<sub>5</sub>), 144,7 (C<sub>6</sub>), 129,6 (C<sub>3</sub>), 121,5 (C<sub>8</sub>), 109,1 (C<sub>4</sub>), 107,8 (C<sub>7</sub>), 100,5 (C metileno), 71,0 (C<sub>1</sub>), 69,5 (C<sub>1'</sub>), 35,1 (C<sub>2</sub>), 31,2 (C<sub>2'</sub>), 18,7 (C<sub>3'</sub>), 13,6 (C<sub>4'</sub>). **EM** (CI), *m/z* (int. relativa): 222 (21%), 135 (100%), 57 (39%). **EM-AR** *m/z*: 222,1269 (5,9 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>: C, 70,24; H, 8,16. Encontrado: C, 70,04; H, 8,40.

• 1,2-(dioximetilidén)-4-(2'-hexiloxietil)benceno (135)

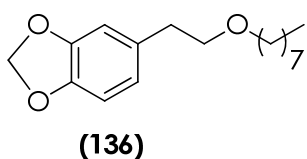


(135)

Se prepara siguiendo el procedimiento general (Apartado 4.3.1.) usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:40. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (78%). **IR**: 3027 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}2-\text{H}}$ ), 2928 y 2856 ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}3-\text{H}}$ ), 1504, 1487 y 1441 ( $\nu_{\text{Ar}}$ ), 1243 y 1106 ( $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ . **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 6,79 (d,  $J_{4,8} = 1,6$  Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6,77 (d,  $J_{7,8} = 7,8$  Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6,66 (dd, 1H, H<sub>8</sub>), 5,93 (s, 2H, metileno), 3,48 (t,  $J_{1,2} = 6,9$  Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 3,33 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H, H<sub>1'</sub>), 2,69 (t, 2H, H<sub>2</sub>), 1,44 (m, 2H, H<sub>2'</sub>), 1,24 (m, 2H, H<sub>3'-H5'</sub>), 0,83 (t, 3H, H<sub>6'</sub>). **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 147,2 (C<sub>5</sub>), 144,7 (C<sub>6</sub>), 129,6 (C<sub>3</sub>), 121,5 (C<sub>8</sub>), 109,1 (C<sub>4</sub>), 107,8 (C<sub>7</sub>),

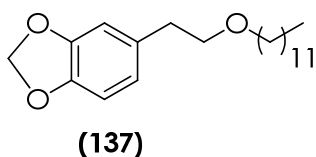
100,5 (C metileno), 71,0 (C<sub>1</sub>), 69,8 (C<sub>1'</sub>), 35,1 (C<sub>2</sub>), 31,0 (C<sub>5'</sub>), 29,0 (C<sub>2'</sub>), 25,2 (C<sub>3'</sub>), 22,0 (C<sub>4'</sub>), 13,7 (C<sub>6'</sub>). **EM** (Cl), *m/z* (int. relativa): 250 (47%), 135 (100%), 85 (21%). **EM-AR** *m/z*: 250,1567 (0,8 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>: C, 71,97; H, 8,86. Encontrado: C, 71,64; H, 8,97.

• 1,2-(dioximetilidén)-4-(2'-octiloxietil)benceno (136)



Se prepara siguiendo el procedimiento general (Apartado 4.3.1.) usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:60. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (70%). **IR**: 3035 (ν<sub>C<sub>sp</sub>2-H</sub>), 2924 y 2854 (ν<sub>C<sub>sp</sub>3-H</sub>), 1504, 1487 y 1441 (ν<sub>Ar</sub>), 1244 y 1107 (ν<sub>C-O</sub>) cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 6,79 (d, J<sub>4,8</sub> = 1,6 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6,77 (d, J<sub>7,8</sub> = 7,9 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6,65 (dd, 1H, H<sub>8</sub>), 5,93 (s, 2H, metileno), 3,48 (t, J<sub>1,2</sub> = 6,9 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 3,33 (t, J = 6,5 Hz, 2H, H<sub>1'</sub>), 2,69 (t, 2H, H<sub>2</sub>), 1,44 (m, 2H, H<sub>2'</sub>), 1,24 (m, 2H, H<sub>3'-H<sub>7'</sub></sub>), 0,84 (t, 3H, H<sub>8'</sub>). **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 147,2 (C<sub>5</sub>), 144,7 (C<sub>6</sub>), 129,6 (C<sub>3</sub>), 121,5 (C<sub>8</sub>), 109,1 (C<sub>4</sub>), 107,8 (C<sub>7</sub>), 100,5 (C metileno), 71,0 (C<sub>1</sub>), 69,8 (C<sub>1'</sub>), 35,1 (C<sub>2</sub>), 31,2 (C<sub>6'</sub>), 29,1 (C<sub>2'</sub>), 28,7 (C<sub>4'</sub>), 28,6 (C<sub>5'</sub>), 25,6 (C<sub>3'</sub>), 22,0 (C<sub>7'</sub>), 13,8 (C<sub>8'</sub>). **EM** (Cl), *m/z* (int. relativa): 278 (38%), 149 (11%), 135 (100%). **EM-AR** *m/z*: 278,1889 (2,5 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>: C, 73,34; H, 9,41. Encontrado: C, 73,60; H, 9,51.

• 1,2-(dioximetilidén)-4-(2'-dodeciloxietil)benceno (137)

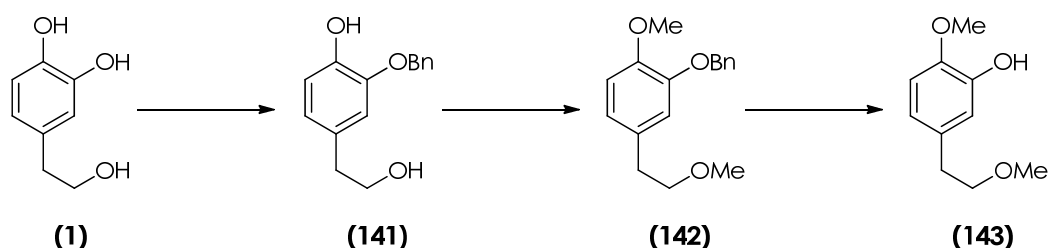


Se prepara siguiendo el procedimiento general (Apartado 4.3.1.) usando como eluyente para la columna de cromatografía una mezcla *t*-butilmetil éter/hexano 1:60. Se obtiene el producto puro como un sirupo incoloro (75%). **IR**: 3037 (ν<sub>C<sub>sp</sub>2-H</sub>), 2923 y 2853 (ν<sub>C<sub>sp</sub>3-H</sub>), 1504, 1487 y 1442 (ν<sub>Ar</sub>), 1244 y 1107 (ν<sub>C-O</sub>) cm<sup>-1</sup>. **<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 6,97 (d, J<sub>4,8</sub> = 1,5 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6,77 (d, J<sub>7,8</sub> = 7,9 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6,65 (dd, 1H, H<sub>8</sub>), 5,93 (s, 2H, metileno), 3,48 (t, J<sub>1,2</sub> = 6,9 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 3,33 (t, J = 6,5 Hz, 2H, H<sub>1'</sub>), 2,68 (t, 2H, H<sub>2</sub>), 1,44 (m, 2H, H<sub>2'</sub>), 1,24 (m, 2H, H<sub>3'-H<sub>11'</sub></sub>), 0,84 (t, 3H, H<sub>12'</sub>). **<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, DMSO-

$\delta$  ppm 147,2 (C<sub>5</sub>), 144,7 (C<sub>6</sub>), 129,6 (C<sub>3</sub>), 121,5 (C<sub>8</sub>), 109,1 (C<sub>4</sub>), 107,8 (C<sub>7</sub>), 100,5 (C metileno), 71,0 (C<sub>1</sub>), 69,8 (C<sub>1'</sub>), 35,1 (C<sub>2</sub>), 31,2 (C<sub>10'</sub>), 29,1 (C<sub>2'</sub>), 28,9-28,6 (C<sub>4'</sub>-C<sub>9'</sub>), 25,6 (C<sub>3'</sub>), 22,0 (C<sub>11'</sub>), 13,8 (C<sub>12'</sub>). **EM** (Cl),  $m/z$  (int. relativa): 334 (43%), 149 (10%), 135 (100%). **EM-AR**  $m/z$ : 278,1889 (2,5 ppm). **Anal. Elem.** Calc. para C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub>: C, 73,34; H, 9,41. Encontrado: C, 73,60; H, 9,51.

#### 4.3.4. Síntesis de 2-metoxi-5-(2'-metoxietil)fenol (143)

Se ha llevado a cabo la síntesis de un regioisómero del metil derivado del alcohol homovanílico, en el que el grupo OCH<sub>3</sub> que aparece en el anillo aromático se encuentra en posición 6 (esquema 11).



Esquema 11. Esquema sintético seguido para la obtención del compuesto 143.

Para ello, tal y como se describe en los siguientes apartados, en una primera etapa fue necesaria la protección regioselectiva del grupo OH en posición 5 dando lugar al compuesto 141. A continuación, se procedió a la alquilación de los dos grupos OH que quedan libres en la molécula obteniéndose de este modo el compuesto 142. Por último, se llevó a cabo la desprotección del grupo OH en posición 5 obteniéndose el compuesto buscado (143).

##### 4.3.4.1. Ensayo de protección regioselectiva. Obtención del 3-O-bencil hidroxitirosol

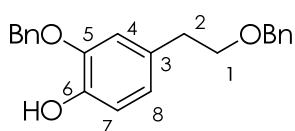
Una disolución de 1 (200 mg, 1,30 mmoles) en acetona seca (15 mL) se hace reaccionar con bromuro de bencilo (1,30 mmoles) en presencia de

carbonato potásico ( $K_2CO_3$ , 0,65 mmoles) a reflujo. Se deja la mezcla en agitación durante 45 minutos y, pasado este tiempo, se enfría. A continuación, se filtra a través de celita, el disolvente se evapora a sequedad y el crudo de reacción se hace pasar por columna cromatográfica empleando una mezcla de éter dietílico/hexano con gradiente de polaridad desde 1:8 hasta 1:3.

Se aislaron un total de cuatro fracciones. Los compuestos identificados en cada una de ellas se detallan a continuación.

*Fracción 1:* se obtiene como un sirupo incoloro (3,4% del total) compuesto de dos productos:

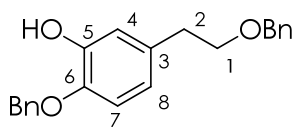
- 2-(benciloxi)-4-(2'-benciloxietil)fenol (138)



**(138)**

Aparece en la fracción 1 como el producto mayoritario (2,4%).  $^1H$ -RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,73 (s, 1H, OH en pos. 6), 7,35 (m, 5H, Ph), 6,87 (d,  $J_{4,8} = 1,97$  Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6,69 (d,  $J_{7,8} = 8,0$  Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6,61 (dd, 1H, H<sub>8</sub>), 5,03 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph en pos. 5), 4,44 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph en pos.1), 3,55 (t,  $J_{1,2} = 6,9$  Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2,70 (t, 2H, H<sub>2</sub>).  $^{13}C$ -RMN (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 146,2 (C<sub>5</sub>), 145,1 (C<sub>6</sub>), 129,6 (C<sub>3</sub>), 128,3-127,5 (C<sub>2''</sub>-C<sub>4''</sub>, grupo OBn), 115,5 (C<sub>7</sub>), 115,1 (C<sub>4</sub>), 71,7 (CH<sub>2</sub>, grupo OBn en pos. 5), 70,8 (C<sub>1</sub>), 69,9 (CH<sub>2</sub> grupo OBn en pos. 1), 35,0 (C<sub>2</sub>).

- 2-(benciloxi)-5-(2'-benciloxietil)fenol (139)

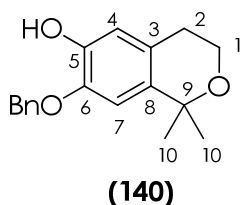


**(139)**

Aparece en la fracción 1 como el producto minoritario (1%).  $^1H$ -RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,84 (s, 1H, OH en pos. 5), 7,35 (m, 5H, Ph), 6,84 (d,  $J_{7,8} = 8,20$  Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6,68 (d,  $J_{4,8} = 2,31$  Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6,55 (dd, 1H, H<sub>8</sub>), 5,04 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph en pos. 6), 4,45 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph en pos.1), 3,55 (t,  $J_{1,2} = 6,9$  Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2,69 (t, 2H, H<sub>2</sub>).  $^{13}C$ -RMN (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 146,7 (C<sub>5</sub>), 144,8 (C<sub>6</sub>), 131,9 (C<sub>3</sub>), 128,3-127,5 (C<sub>2''</sub>-C<sub>4''</sub>, grupo OBn), 119,2 (C<sub>8</sub>), 116,5 (C<sub>4</sub>), 114,3 (C<sub>7</sub>), 70,7 (C<sub>1</sub>), 71,6 (CH<sub>2</sub>, grupo OBn en pos. 1), 70,0 (CH<sub>2</sub>, grupo OBn en pos. 6), 34,8 (C<sub>2</sub>).

Fracción 2: se aísla un único compuesto en esta fracción:

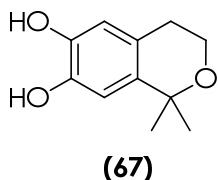
• 7-(benciloxi)-1,1-dimetil-6-hidroxiisocromano (140)



Se obtiene como un sirupo incoloro (17%). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 8,77 (s, 1H, OH en pos. 5), 7,38 (m, 5H, Ph), 6,73 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 6,47 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 5,05 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph en pos. 6), 3,73 (t, J<sub>1,2</sub> = 5,62 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2,52 (t, 2H, H<sub>2</sub>), 1,33 (s, 6H, H<sub>10</sub>).  
<sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 145,1 (C<sub>6</sub>), 144,8 (C<sub>5</sub>), 133,1 (C<sub>8</sub>), 128,3-127,5 (C<sub>2'</sub>-C<sub>4'</sub>, grupo OBn), 125,2 (C<sub>3</sub>), 115,2 (C<sub>4</sub>), 111,9 (C<sub>7</sub>), 73,5 (C<sub>9</sub>), 70,2 (CH<sub>2</sub> grupo OBn en pos. 6), 58,6 (C<sub>1</sub>), 29,5 (C<sub>10</sub>), 28,2 (C<sub>2</sub>).

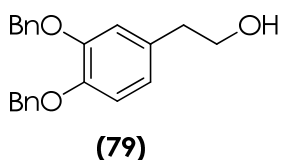
Fracción 3: está constituida por dos sustancias que suponen el 8% del total.

• 1,1-dimetil-6,7-dihidroxiisocromano (67)



Representa el 1% del total. Los datos de RMN están de acuerdo con aquéllos previamente recogidos en la bibliografía<sup>156</sup>.

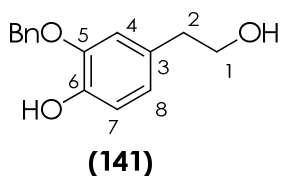
• 2-(3',4'-bis(benciloxi)fenil)etanol (79)



Representa el 7% del total. Los datos de RMN concuerdan con aquéllos previamente recogidos en la bibliografía<sup>195</sup>.

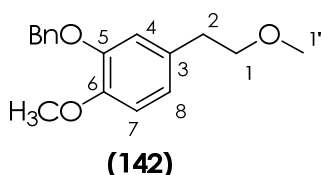
Fracción 4: en esta fracción se obtiene un único compuesto que, además, es el buscado.

• 2-(benciloxi)-4-(2'-hidroxietil)fenol (141)



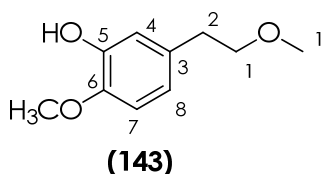
Se obtiene como un sirupo incoloro (25%). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 8,69 (s, 1H, OH en pos. 6), 7,38 (m, 5H, Ph), 6,82 (d, J<sub>4,8</sub> = 1,95 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6,68 (d, J<sub>7,8</sub> = 7,98 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6,58 (dd, 1H, H<sub>8</sub>), 5,05 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph en pos. 5), 3,50 (t, J<sub>1,2</sub> = 7,32 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2,57 (t, 2H, H<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 146,3 (C<sub>5</sub>), 145,0 (C<sub>6</sub>), 130,0 (C<sub>3</sub>), 128,3-127,5 (C<sub>2''</sub>-C<sub>4''</sub>, grupo OBn), 121,4 (C<sub>8</sub>), 115,5 (C<sub>7</sub>), 115,1 (C<sub>4</sub>), 69,9 (CH<sub>2</sub>, grupo OBn en pos. 5), 62,4 (C<sub>1</sub>), 38,5 (C<sub>2</sub>).

4.3.4.2. Reacción de metilación del 3-O-bencil hidroxitirosol (141)



Se prepara siguiendo el procedimiento de alquilación general (Apartado 4.3.1.). Se obtiene el compuesto **142** como un sirupo incoloro (85%). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 7,37 (m, 5H, Ph), 6,92 (d, J = 2,1 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6,85 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6,56 (dd, 1H, H<sub>8</sub>), 5,03 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph en pos. 5), 3,70 (s, 3H, OMe en pos. 6), 3,44 (t, J = 7,0 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 3,21 (s, 3H, H<sub>1'</sub>), 2,63 (t, 2H, H<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 147,5 (C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>), 131,4 (C<sub>3</sub>), 137,2 (C<sub>ipso</sub>, grupo OBn), 128,3-127,7 (C<sub>2''</sub>-C<sub>4''</sub>, grupo OBn), 121,1 (C<sub>8</sub>), 112,2 (C<sub>7</sub>), 114,7 (C<sub>4</sub>), 72,9 (C<sub>1</sub>), 69,9 (CH<sub>2</sub>Ph en pos. 6), 57,7 (C<sub>1'</sub>), 55,6 (OMe en pos. 6), 34,8 (C<sub>2</sub>).

4.3.4.3. Reacción de hidrogenolisis del compuesto **142**

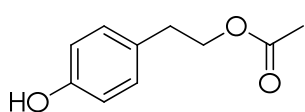


Se prepara siguiendo el procedimiento de hidrogenolisis general (Apartado 4.3.2.). Se obtiene el compuesto **143** como un sirupo incoloro (80%). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 8,74 (s, 1H, OH pos. 6), 6,78 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6,62 (d, J = 2,2 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6,56 (dd, 1H, H<sub>8</sub>), 3,70 (s, 3H, OMe en pos. 6), 3,44 (t, J = 6,9 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 3,21 (s, 3H, H<sub>1'</sub>), 2,63 (t, 2H, H<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 146,2 (C<sub>6</sub>), 145,9 (C<sub>5</sub>), 131,6 (C<sub>3</sub>), 119,2 (C<sub>8</sub>), 116,1 (C<sub>4</sub>), 112,3 (C<sub>7</sub>), 73,0 (C<sub>1</sub>), 57,7 (C<sub>1'</sub>), 55,6 (OMe en pos. 5), 34,6 (C<sub>2</sub>).

#### 4.3.5. Synthesis of hydroxytyrosol and its protected forms via Baeyer-Villiger oxidation

The synthesis of hydroxytyrosol from commercial tyrosol through several steps was carried out as follows:

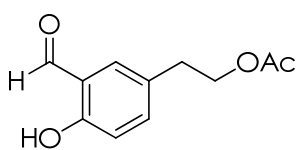
##### 4.3.5.1. Reaction of acetylation of tyrosol (**2**)



**(16)**

The OH alcoholic group from starting tyrosol is protected as its corresponding acetate<sup>32</sup>. Tyrosol (1 mmol) and ethyl acetate (10 mL) were heated at 70 °C in presence of *p*-toluenesulfonic acid (10 mg) until completion of the reaction (TLC). The resulting mixture was concentrated, and the pure compound (95%) was obtained after column chromatography eluting with hexane/diethyl ether (1:1). NMR data were in good accordance with those previously reported<sup>32</sup>.

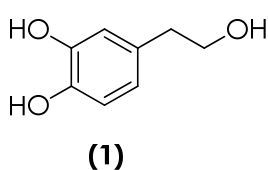
##### 4.3.5.2. Reaction of formylation of tyrosyl acetate (**15**)



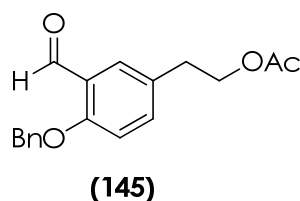
**(144)**

The obtained tyrosyl acetate was formylated according to Maruyama et al.<sup>198</sup> Thus, tyrosyl acetate (2.5 mmol), anhydrous magnesium dichloride (3.75 mmol), and dry triethylamine (9.5 mmol) were mixed in dry acetonitrile (4 mL). To this mixture dry paraformaldehyde (17 mmol) was added, and the reaction mixture was heated under reflux for 15 h. The reaction was monitored by TLC, and upon consumption of the starting phenol, the mixture was cooled. The reaction mixture was then acidified using HCl (1 N) and extracted with ethyl acetate (3x30 mL). The extracts were combined and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent removed under vacuum. Pure **144** (62%) was obtained after column chromatography eluting with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. NMR data were in good accordance with those previously reported<sup>199</sup>.

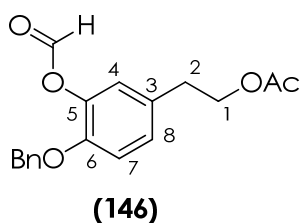


4.3.5.3. Baeyer-Villiger type oxidation of formyl tyrosyl acetate (**144**)

To a solution of **144** (2.98 g, 15.5 mmol) in 100 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added in small portions *m*-CPBA (4.93 g, 28.6 mmol) and the mixture was stirred for 24 h at 40°C. The solution was concentrated under reduced pressure, the residue dissolved in 60 ml of methanolic NH<sub>3</sub> (4 M) and stirred for 72 h at room temperature. The mixture was concentrated and quickly filtered through a short pad of SiO<sub>2</sub> using AcOEt/petroleum ether to give pure **1** (2.08 g, 87%). NMR data were in good accordance with those previously reported by Capasso *et al.*<sup>200</sup>.

4.3.5.4. Synthesis of the protected forms of hydroxytyrosol (**1**)• 4'-(benzyloxy)-3'-formylphenethyl acetate (**145**)

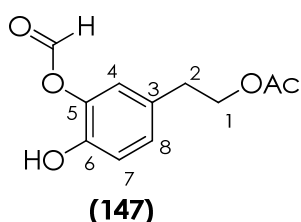
To a solution of **144** (1 g, 5.1 mmol) in 15 mL of DMF were added K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.3 g, 9.6 mmol), a catalytic amount of NaI and BnBr (0.8 mL, 7.2 mmol) and the mixture was stirred for 24h at 60 °C. The solution was diluted with 10 mL of *t*-butyl methyl ether and the resulting mixture was extracted with distilled water (1x10 mL) and brine (1x10 mL) and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed under vacuum. Pure **145** (90%) was obtained as a colorless oil after column chromatography eluted with *t*-butyl methyl ether/hexane 1:3. NMR data were in good accordance with those previously reported<sup>201</sup>.

• 4'-(benzyloxy)-3'-(formyloxy)phenethyl acetate (**146**)

To a solution of **145** (3g, 10.6 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) was added a catalytic amount of diphenylselenide (180 mg, 0.77 mmol) followed by the addition of 2.7 mL of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reaction mixture was stirred at rt for 48 h followed by work-up according to Syper *et al.*<sup>202</sup>. Flash

chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave pure **146** (2.66 g, 84%) as a colorless oil. **<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.28 (s, 1H, CHO), 7.38 (m, 5H, Ph), 6.98-7.1 (m, 3H, H<sub>4</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>), 5.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph in pos. 6), 4.26 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2.89 (t, 2H, H<sub>2</sub>), 2.05 (s, 3H, H<sub>2</sub>'). **<sup>13</sup>C-NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 170.9 (C<sub>1</sub>'), 159.1 (C formiate), 144.6 (C<sub>6</sub>), 139.0 (C<sub>5</sub>), 136.4 (C<sub>ipso</sub>, Bn group), 131.1 (C<sub>3</sub>), 128.6-127.3 (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, Bn group), 123.1 (C<sub>4</sub>)\*, 120.3 (C<sub>8</sub>)\*, 114.2 (C<sub>7</sub>), 70.8 (CH<sub>2</sub>Ph), 64.6 (C<sub>1</sub>), 34.0 (C<sub>2</sub>), 20.9 (C<sub>2</sub>').

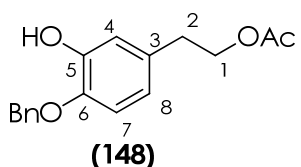
• 3'-(formyloxy)-4'-hidroxyphenetyl acetate (147)



To a solution of **146** (2.64 g, 8.86 mmol) in dry AcOEt (80 mL), 10% Pd/C was added (100 mg) and the mixture was hydrogenated at 1 atm of H<sub>2</sub> (balloon) at room temperature. After 30 minutes the mixture was filtered through a pad of celite and washed with EtOH (4 mL).

The filtrate was concentrate under reduced pressure to give **147** (1.83 g, 98%) as a colorless oil. **<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.31 (s, 1H, formiate group), 6.75-7.07 (m, 3H, H<sub>4</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>), 4.25 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 2.88 (m, 2H, H<sub>2</sub>), 2.06 (s, 3H, H<sub>2</sub>'). **<sup>13</sup>C-NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 171.4 (C<sub>1</sub>'), 159.9 (C formiate), 146.9 (C<sub>6</sub>)\*, 145.5 (C<sub>5</sub>)\*, 130.7 (C<sub>3</sub>), 127.8 (C<sub>8</sub>), 122.4 (C<sub>4</sub>)\*, 121.2 (C<sub>7</sub>)\*, 64.8 (C<sub>1</sub>), 34.3 (C<sub>2</sub>), 21.0 (C<sub>2</sub>').

• 4'-(benzyloxy)-3'-hydroxyphenethyl acetate (148)

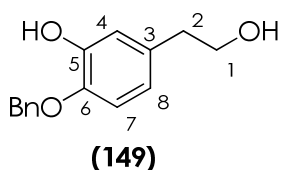


To a cooled (0°C) solution of **146** (1.65 g, 5.25 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL), 12.5 mL of NH<sub>3</sub> (2M in MeOH) were added and the reaction was stirred at the same temperature for 1 hour. The reaction mixture was concentrated, dissolved in 50 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed with saturated NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Flash chromatography (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetone 98:2) gave pure **148** (89%) as a colorless oil. **<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.42 (m, 5H, Ph), 6.66-6.89 (m, 3H, H<sub>4</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>), 5.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph in pos. 6), 4.25 (t, J = 7.1 Hz, 2H,

\* Signals don't differenciable.

$H_1$ ), 2.85 (t, 2H,  $H_2$ ), 2.05 (s, 3H,  $H_{2'}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 171.4 ( $C_{1'}$ ), 146.1 ( $C_6$ )\*, 144.8 ( $C_5$ )\*, 136.7 ( $C_{\text{ipso}}$ , Bn group), 131.8 ( $C_3$ ), 129.1-128.1 ( $C_2$ - $C_4$  Bn group), 120.6 ( $C_8$ ), 115.6 ( $C_4$ ), 112.5 ( $C_7$ ), 71.5 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 65.4 ( $C_1$ ), 34.8 ( $C_2$ ), 21.3 ( $C_{2'}$ ).

• 2-(benzyloxy)-5-(-2'-hydroxyethyl)phenol (149)



A solution of **146** (2.8 g, 9.4 mmol) in 20 mL of  $\text{NH}_3$  (2M in MeOH) was stirred at rt for 96 h and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL), washed with 0.1 M citric acid (10 mL), 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  (10 mL) and dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Solvent was evaporated under reduced pressure to give pure **147** (2.18 g, 95%).  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.44-7.39 (m, 5H, Ph), 6.90-6.85 (m, 2H,  $H_4, H_7$ ), 6.70 (m, 1H,  $H_8$ ), 5.10 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  in pos. 6), 3.83 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 2.79 (t, 2H,  $H_1$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 146.0 ( $C_6$ )\*, 144.5 ( $C_5$ )\*, 136.4 ( $C_{\text{ipso}}$ , Bn group), 132.1 ( $C_3$ ), 128.7-127.7 ( $C_2$ - $C_4$  Bn group), 120.4 ( $C_8$ ), 115.3 ( $C_4$ ), 112.4 ( $C_7$ ), 71.3 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 63.6 ( $C_1$ ), 38.5 ( $C_2$ ).

#### 4.4. Aparatos y procedimientos analíticos generales

Los instrumentos utilizados han sido los siguientes:

- Liofilizador Virtis Mod. BT 4K ZL.
- Analizador elemental Leco Mod. CHN-932.
- Equipos para la determinación del punto de fusión, Gallenkamp y SMP10 Melting Point.

\* Signals don't diferenciable.

- Espectrofotómetro de infrarrojos (IR), Jasco FT/IR-410 de transformada de Fourier.
- Espectrofotómetros de resonancia magnética nuclear (RMN), Bruker AMX-500 y Avance-500 operando ambos a 500,13 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 125,75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) y AMX-200 operando a 200 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 50 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) con las señales residuales del disolvente a 2,49 ppm ( $^1\text{H}$ ) y 39,5 ppm ( $^{13}\text{C}$ ) en el caso de DMSO- $d_6$  y 7,26 ppm ( $^1\text{H}$ ) y 77,0 ppm ( $^{13}\text{C}$ ) en el caso del  $\text{Cl}_3\text{CD}$ , como referencias. Los espectros se han registrado a 303K. Se han obtenido espectros monodimensionales ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), así como bidimensionales (COSY, NOESY, HSQC, HMBC) para la asignación de las señales observadas.
- Espectrómetro de masas (EM), Micromass AUTOSPECQ, de alta resolución IC, IE y FAB, para la determinación de los pesos moleculares y fórmulas moleculares.
- Espectrofotómetro UV-Visible Varian (Cary 50 BIO) con adaptador para dieciocho celdas y baño termostatzado para determinación de métodos de capacidad antioxidante.
- Equipo HPLC Perkin-Elmer con sistema de inyección manual Rheodyne y detector UV-Visible (LC 295), para la determinación de  $\alpha$ -tocoferol.
- Cromatógrafo de gases Perkin-Elmer (serie 8410) equipado con un sistema de inyección split/splitless, columna capilar y detección de ionización de llama (FID), para la determinación de la composición en ácidos grasos.
- Equipo 743 Rancimat (Metrohm, Suiza), para la determinación de la estabilidad oxidativa en matrices triglicéridicas.
- Lector de multiplacas Bio-Tek, Winooski, VT, USA.

- Lector automático de placas Multiskan Ex. Mod. 355 (Labsystems).
- Lector de placa Biochrom Asys Hitech Expert 96 (Eugendorf; Austria).
- Cromatografía en capa fina (ccf): esta técnica se ha utilizado como método analítico cualitativo, empleando cromatofolios de aluminio (Merck, 60 F<sub>254</sub>) de un espesor de capa de 0,20 mm. Los reveladores usados fueron: luz ultravioleta de 254 nm, y una disolución etanólica de ácido fosfomolibdico. En este último caso el revelado se ha realizado por inmersión de la placa en el revelador y posterior calentamiento en placa calefactora durante 1-2 minutos.
- Cromatografía en columna: este procedimiento se ha utilizado con fines preparativos. El soporte empleado ha sido gel de sílice 60 (Merck) usando la técnica conocida como “*flash chromatography*”. El eluyente empleado se indica en cada caso. Las fracciones colectadas se analizaron por ccf.

#### **4.5. Determinación de la estabilidad oxidativa de matrices lipídicas**

La actividad antioxidante de los nuevos compuestos de síntesis se ha determinado a través de la medida de la estabilidad oxidativa que proporcionan a una matriz lipídica, mediante el procedimiento acelerado de oxidación Rancimat<sup>®</sup>. Para ello, matrices lipídicas libres de antioxidantes se siembran con concentraciones crecientes de los compuestos sintetizados y se oxidan de forma acelerada en un equipo Rancimat (Mod. 743, Metrohm, Suiza). A continuación, se exponen los detalles de este procedimiento.

##### ***4.5.1. Matriz lipídica.***

Los aceites utilizados para la obtención de las matrices lipídicas libres de antioxidantes son los siguientes:

- Aceite de girasol comercial, adquirido en un supermercado. La composición en ácidos grasos ha resultado ser (*apartado 4.5.3.*): 6,1% en ácido palmítico (C16:0), 0,1% en ácido palmitoleico (C16:1), 3,6% en ácido esteárico (C18:0), 29,3% en ácido oleico (C18:1), 59,7% en ácido linoleico (C18:2), 0,1% en ácido linolénico (C18:3) y 0,6% en ácido behénico (C22:0).

- Aceite de oliva virgen extra de la variedad 'Arbequina', cedido por el Centro IFAPA Venta del Llano (Jaén). La composición en ácidos grasos es: 15,5% en ácido palmítico (C16:0), 1,7% en ácido palmitoleico (C16:1), 0,1% en ácido heptadecanoico (C17:0), 0,2% en ácido heptadecenoico (C17:1), 2,0% en ácido esteárico (C18:0), 67,5% en ácido oleico (C18:1), 11,8% en ácido linoleico (C18:2), 0,5% en ácido linolénico (C18:3), 0,4% en ácido araquídico (C20:0), 0,2% en ácido gadoleico (C20:1) y 0,1% en ácido behénico (C22:0).

#### ***4.5.2. Purificación de la matriz lipídica***

Para obtener las matrices lipídicas exentas de los estabilizantes, se purifican los aceites mediante el procedimiento "free solvent"<sup>203</sup>. Para ello se pesan 200 g de aceite y se introducen a través de una columna de vidrio (450 mm x 30 mm d.i.) rellena de 100 g de alúmina previamente activada durante 3 horas a 200 °C en una estufa. La salida de la columna se conecta a un matraz kitasato al que se aplica vacío y el aceite se eluye hasta que el nivel de aceite alcanza la parte superior del relleno. Tanto la columna como el matraz de recogida se mantienen al abrigo de la luz, para proteger el aceite de la oxidación. A las matrices lipídicas así obtenidas se les determina la composición en ácidos grasos para comprobar que su composición no ha variado a lo largo del proceso, y la composición de tocoferoles con el fin de comprobar la ausencia de estos compuestos y evitar interferencias en los ensayos con estas matrices glicerídicas.

#### **4.5.3. Determinación de la composición en ácidos grasos**

La determinación analítica de los ácidos grasos presentes en la matriz lipídica se lleva a cabo por cromatografía en fase gaseosa, previa formación de sus ésteres metílicos.

En primer lugar se preparan los ésteres metílicos mediante una transesterificación de los triglicéridos. Para ello se disuelven 6 gotas de aceite en 2,5 mL de metóxido sódico al 0,5 % (p/v) en metanol y se deja en ebullición durante 10 min. Al cabo de ese tiempo, se añaden 2,5 mL de ácido sulfúrico al 4% (v/v) en metanol calentando a ebullición otros 10 min. Se deja enfriar y se extrae con 6 mL de heptano (en porciones de 2 mL) lavando seguidamente con salmuera. Finalmente, se deja reposar para que se separen bien las fases y se inyecta la fase heptanólica que contiene los ésteres metílicos en el cromatógrafo de gases (Perkin-Elmer, Serie 8412) equipado con un sistema de inyección split/splitless, columna capilar BPX70 (50 m x 0.25 mm d.i., 0.25  $\mu$ m) impregnada con fase estacionaria de alta polaridad (SP-2380), auto-muestreador y detector de ionización de llama (FID)<sup>204</sup>. Como gas portador se utiliza helio y la temperatura del horno, inyector y detector se establecen en 198, 235 y 245 °C, respectivamente.

#### **4.5.4. Determinación de $\alpha$ -tocoferol**

La determinación de  $\alpha$ -tocoferol se lleva a cabo mediante la aplicación del protocolo detallado en la norma IUPAC 2.432<sup>205</sup>. En un matraz aforado de 10 mL se pesan 1,5 g de aceite y se enrasa con hexano. 20  $\mu$ L de esta disolución se inyectan directamente en el HPLC con detector UV-Visible (Perkin Elmer, Serie 400, LC 295), con sistema de inyección manual Rheodyne, equipado con una bomba (LC200) que funciona en modo isocrático. Se utiliza una columna de sílice Lichrorb SI 60 (250 mm x 4 mm d.i., 5  $\mu$ m), un flujo de 1 mL/min y una mezcla de hexano/isopropanol (99:1, v/v) como fase móvil,

siendo el tiempo de análisis de 20 min. La detección se lleva a cabo a una longitud de onda de 256 nm.

La cuantificación se realiza mediante el uso de una recta de calibrado con tocoferol patrón. Para ello se pesan con exactitud del miligramo, 10 mg de tocoferol en un matraz aforado de 100 mL y se enrasa con hexano. A continuación, 10 mL de esta disolución se llevan a sequedad y se redisuelven en 10 mL de metanol. Esta disolución se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 256 nm. La concentración exacta de la disolución de tocoferol así preparada se determina mediante la siguiente fórmula:

$$C = \frac{A_{256}}{0,0076}$$

Donde:

C = Concentración de tocoferol ( $\mu\text{g/mL}$ )

$A_{256}$  = Absorbancia a 256 nm

A continuación se procede a realizar diferentes diluciones a partir de esta disolución madre y se inyectan en el cromatógrafo líquido determinando las correspondientes áreas. Mediante la siguiente ecuación se determina la cantidad de tocoferol en ppm.

$$C_x = \frac{C_p \cdot A_x \cdot P_p}{A_p \cdot P_x}$$

Donde:

$C_x$  = Concentración de tocoferol en la muestra (ppm)

$C_p$  = Concentración Patrón (ppm)

$A_x$  = Área de la muestra

$A_p$  = Área del patrón

$P_p$  = Peso de aceite patrón (mg)

$P_x$  = Peso de aceite de la muestra (mg)



#### 4.5.5. Oxidación acelerada de matrices lipídicas. Método Rancimat®

La determinación de la estabilidad oxidativa se realiza mediante el procedimiento acelerado Rancimat®, donde la oxidación tiene lugar con saturación de aire y a temperatura elevada (80-100°C). La medida se fundamenta en la detección conductimétrica de los productos producidos por la oxidación secundaria del aceite, principalmente ácidos de cadena corta<sup>194</sup>.

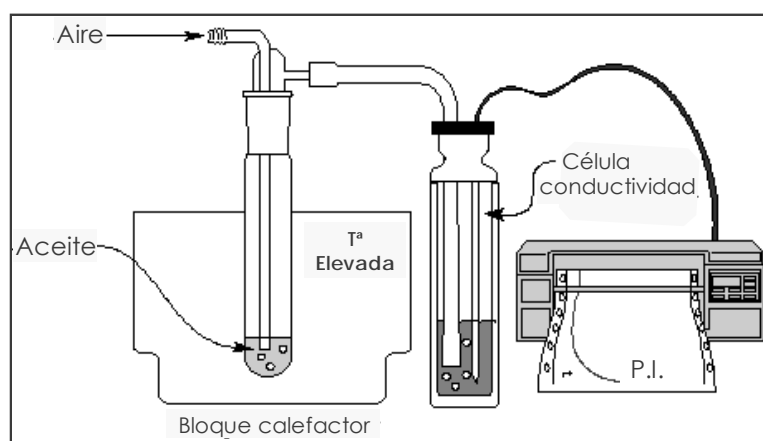


Figura 7. Esquema del equipo de oxidación acelerada, Rancimat®.

El aparato (figura 7) consta de un bloque calefactor con capacidad para 8 tubos donde se coloca el aceite. Un flujo controlado de aire se hace pasar por el aceite y, a la vez que lo oxida arrastra los volátiles formados que se recogen en un frasco borboteador que contienen agua desionizada y una célula que mide continuamente la conductividad del agua. Cuando se inicia la oxidación secundaria, se desprenden los primeros compuestos volátiles, principalmente ácido fórmico, que son retenidos en el agua desionizada dando lugar a un aumento de la conductividad. El tiempo que tardan en generarse los compuestos volátiles polares como consecuencia del inicio de la oxidación secundaria de la grasa se denomina periodo de inducción (P.I.) y se mide en horas. El punto de inflexión de la curva de conductividad, denominada curva de oxidación, define el punto final del periodo de inducción y se determina por la intersección de la línea base con la tangente a la curva trazada cuando aumenta bruscamente la conductividad.

Para determinar la estabilidad oxidativa de las matrices lipídicas, se pesan 2,5 g de aceite purificado como se ha indicado previamente, con la exactitud del miligramo, en cada tubo. A continuación se añaden volúmenes crecientes (50, 150, 250, 400 y 500  $\mu\text{L}$ ) de los distintos antioxidantes que se deseen analizar disueltos en etanol a una concentración de 10 mM. Se agita y el disolvente se evapora con nitrógeno y en ausencia de luz. A continuación, los tubos se colocan en el bloque de calentamiento y se conectan por un extremo al surtidor de aire a un flujo de 15 L/h, mientras que el otro extremo se une a los borboteadores que contienen 90 mL de agua desionizada. Los electrodos introducidos en el agua registran la conductividad de forma continua frente al tiempo. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

#### **4.6. Estimación de la capacidad antioxidante in vitro**

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos puros en disolución se ha determinado mediante los métodos **FRAP**, **ABTS** y **ORAC**.

##### ***4.6.1. Capacidad reductora (Método FRAP)***

El ensayo FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) se utiliza para medir la capacidad reductora de los compuestos fenólicos por espectrofotometría mediante el método de Benzie y Strain<sup>179</sup> con algunas modificaciones<sup>206</sup>. Este método se basa en el aumento de la absorbancia del complejo tripiridiltriazina (TPTZ)-Fe(III) en presencia de agentes antioxidantes. A pH bajo, el complejo formado por (TPTZ) y Fe(III) es reducido por los antioxidantes a su forma ferrosa Fe(II), desarrollando un intenso color azul con una absorción máxima a 595 nm (pH 3.6, 37 °C).

Se preparan concentraciones conocidas de antioxidante utilizando como disolvente metanol. Dichas concentraciones fueron de entre 100 y 500  $\mu\text{M}$  para los alquil éteres de hidroxitirosol, entre 1000 y 5000  $\mu\text{M}$  para los alquil

éteres de tirosol y entre 100 y 600  $\mu\text{M}$  para los alquil éteres de alcohol homovanílico. En la cubeta del espectrofotómetro se mezclan 900  $\mu\text{L}$  de reactivo FRAP con 90  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 30  $\mu\text{L}$  de muestra. El reactivo FRAP, que se prepara diariamente, contiene 25 mL de tampón acetato 0,3 M (pH 3,6), 25 mL de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y 2,5 mL de tricloruro de hierro hexahidratado 20 mM. Se agita la cubeta manualmente durante 15 segundos y se colocan por orden de agitación en el portador multicubeta del espectrofotómetro UV-Visible (Cary 50 BIO) con baño termostático. Se leen las absorbancias durante 32 min cada 20 segundos a 595 nm y a una temperatura de 37°C. Todas las medidas se realizan por triplicado. Paralelamente se efectúa un blanco mediante la mezcla en la cubeta de reacción de 900  $\mu\text{L}$  de reactivo FRAP con 90  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 30  $\mu\text{L}$  de metanol.

Los valores de absorbancia que se tienen en cuenta para llevar a cabo la determinación cuantitativa son los correspondientes a tiempo 30 min, siempre considerando la carencia de 20 segundos que existe entre las distintas cubetas de análisis.

Para calcular la capacidad reductora de una muestra, se toma como referencia la recta de calibrado determinada para el patrón de Trolox entre 50 y 1000 mM en metanol. Los resultados se expresan como Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox (TEAC, mM) que se define como la concentración de antioxidante equivalente a la actividad mostrada por 1mM de Trolox. Cada determinación se realiza por triplicado.

#### ***4.6.2. Capacidad de secuestro de radicales libres***

##### ***4.6.2.1. Método ABTS***

La capacidad de secuestro de radicales libres se determina espectrofotométricamente por el método de decoloración de Re y col.<sup>182</sup>,

conocido por ABTS. Se basa en la disminución de la absorbancia a 730 nm del catión radical, ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>), un cromóforo verde-azulado que se reduce en presencia de antioxidante perdiendo color proporcionalmente a la cantidad presente del mismo.

Se prepara una disolución 7 mM del catión radical ABTS<sup>•+</sup> en frasco topacio, mediante la oxidación de 38,6 mg de ABTS en 10 mL de una solución acuosa de persulfato potásico 2,45 mM, en ausencia de luz y bajo agitación durante 12-16h. El catión radical ABTS<sup>•+</sup> generado se diluye con metanol hasta obtener una absorbancia  $0,70 \pm 0,02$  a 730 nm y se mantiene a 30 °C. Finalmente, se mezclan 3,9 mL de ABTS<sup>•+</sup> con 0,1 mL de muestra problema disuelta en metanol en la cubeta de reacción en concentraciones conocidas de entre 175 y 450  $\mu\text{M}$  para los alquil éteres de hidroxitirosol, entre 500 y 10000  $\mu\text{M}$  para los alquil éteres de tirosol y entre 100 y 800  $\mu\text{M}$  para los alquil éteres de alcohol homovanílico. Se agita por inversión y se leen las absorbancias cada 20 segundos a 730 nm durante 6min en un espectrofotómetro UV-Visible (Cary 50 BIO) con baño termostatizado. Cada determinación se realiza por triplicado.

Paralelamente se efectúa un blanco mediante la mezcla en la cubeta de reacción de 3,9  $\mu\text{L}$  de ABTS<sup>•+</sup> y 0,1  $\mu\text{L}$  de metanol. La absorbancia disminuye con el tiempo por la reducción del ABTS<sup>•+</sup> en presencia del agente antioxidante. Se representa gráficamente el porcentaje de inhibición en función del tiempo y se obtiene la ecuación de la curva que se ajusta a la siguiente función:

$$y = a + 0,5bx$$

Donde "y" es el porcentaje de inhibición y "x" es el tiempo correspondiente a ese valor de porcentaje de inhibición. A continuación se calcula el área bajo la curva (ABC) entre 0 y 360 segundos mediante la correspondiente integral limitada.

Los resultados se expresan como concentración antioxidante equivalente de Trolox (TEAC, en mM). Para ello se realiza una curva de calibrado de Trolox en un rango de concentraciones conocido, comprendido entre 0,1 y 1 mM disuelto en metanol.

#### 4.6.2.2. Método ORAC (Oxygen Radical Scavenging Capacity)

La capacidad de secuestro de radicales libres determinada mediante el método ORAC<sup>192</sup> se basa en la disminución de fluorescencia que se produce tras añadir a la molécula de fluoresceína un generador de radicales libres como es el dihidrocloruro de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (AAPH), que genera radicales peroxilo. En presencia de un antioxidante, esta pérdida de fluorescencia resulta menor cuanto mayor sea la capacidad antioxidante del compuesto a evaluar.

Inicialmente, se preparan disoluciones de concentraciones conocidas de los antioxidantes en estudio utilizando como disolvente una disolución al 7% de  $\beta$ -ciclodextrina (RMCD) en mezcla acetona/agua (1:1, v/v). Dichas concentraciones fueron de entre 2,5 y 20  $\mu$ M para los alquil éteres de hidroxitirosol, de entre 5 y 50  $\mu$ M para los alquil éteres de tirosol y de entre 5 y 40  $\mu$ M para los alquil éteres de alcohol homovanílico. A continuación, se procede a la preparación de la placa de 96 pocillos de color negro y fondo plano según se detalla en el siguiente esquema:

Trolox 6,25 $\mu$ M	Trolox 25 $\mu$ M	Trolox 75 $\mu$ M	M 1	M 3	M 5	M 7	M 9	M 11	M 13	M 15	B
Trolox 6,25 $\mu$ M	Trolox 25 $\mu$ M	Trolox 75 $\mu$ M	M 1	M 3	M 5	M 7	M 9	M 11	M 13	M 15	B
Trolox 6,25 $\mu$ M	Trolox 25 $\mu$ M	Trolox 75 $\mu$ M	M 1	M 3	M 5	M 7	M 9	M 11	M 13	M 15	B
Trolox 6,25 $\mu$ M	Trolox 25 $\mu$ M	Trolox 75 $\mu$ M	M 1	M 3	M 5	M 7	M 9	M 11	M 13	M 15	B
Trolox 12,5 $\mu$ M	Trolox 50 $\mu$ M	Trolox 100 $\mu$ M	M 2	M 4	M 6	M 8	M 10	M 12	M 14	M 16	B
Trolox 12,5 $\mu$ M	Trolox 50 $\mu$ M	Trolox 100 $\mu$ M	M 2	M 4	M 6	M 8	M 10	M 12	M 14	M 16	B
Trolox 12,5 $\mu$ M	Trolox 50 $\mu$ M	Trolox 100 $\mu$ M	M 2	M 4	M 6	M 8	M 10	M 12	M 14	M 16	B
Trolox 12,5 $\mu$ M	Trolox 50 $\mu$ M	Trolox 100 $\mu$ M	M 2	M 4	M 6	M 8	M 10	M 12	M 14	M 16	B

**Leyenda:** M, muestra. B, blanco

En cada pocillo se añaden 150  $\mu\text{L}$  de fluoresceína de concentración  $8,5 \times 10^{-5}$  mM y 25  $\mu\text{L}$  de Trolox o muestra a evaluar. El blanco se prepara con 150  $\mu\text{L}$  de fluoresceína y 25  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 75 mM (pH 7,4). La placa así preparada se introduce en el lector de multiplacas (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) previamente acondicionado a 37 °C. Seguidamente, se adicionan 30  $\mu\text{L}$  de radical AAPH de concentración 153 mM preparado en tampón fosfato 75 mM a pH 7,4 en cada pocillo, para dar comienzo a la reacción. Las lecturas se realizan cada 2 min durante 120 min a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 528 nm. Cada determinación se realiza por cuadruplicado.

El valor que resulta de calcular el área bajo la curva entre 0 y 120 min para cada concentración y cada compuesto a evaluar se corrige con la correspondiente obtenida por el blanco.

Los resultados se expresan como valores ORAC, en  $\mu\text{moles}$  de Trolox por  $\mu\text{moles}$  de antioxidante, calculados según la siguiente ecuación:

$$ORAC = \frac{(AUC_m - AUC_b)}{(AUC_{Trolox} - AUC_b)} \cdot \frac{[Trolox]}{m}$$

Donde:

- $AUC_m$  = Área bajo la curva de la muestra
- $AUC_b$  = Área bajo la curva del blanco
- $AUC_{Trolox}$  = Área bajo la curva del Trolox
- $[Trolox]$  = Concentración del Trolox
- $[m]$  = Concentración de la muestra

Para ello se realiza una curva de calibrado de Trolox en un rango de concentraciones conocido, comprendido entre 6,25 y 100  $\mu\text{M}$  de Trolox en 7% en  $\beta$ -ciclodextrina (RMCD).

## 4.7. Evaluación de la actividad antioxidante en glóbulos rojos

### 4.7.1. Preparación de los glóbulos rojos

Para llevar a cabo estas determinaciones se utilizó sangre humana de voluntarios sanos recogida en el "Centro Trasfusionale" del Hospital de Urbino (Italia). Los eritrocitos se obtuvieron tras centrifugar las muestras de sangre durante 10 minutos a 1100 g y lavando posteriormente tres veces con buffer fosfato salino frío (PBS, phosphate-buffered saline, 125 mM NaCl, 10 mM fosfato sódico, pH 7,4) con objeto de eliminar el plasma, plaquetas y la capa leucocitaria. Una vez obtenidos los glóbulos rojos, éstos se suspendieron en PBS y se procedió a determinar y ajustar el hematocrito que debía ser del 20%.

### 4.7.2. Evaluación de la lipoperoxidación lipídica de la membrana de los glóbulos rojos

Para llevar a cabo la evaluación de la lipoperoxidación lipídica en glóbulos rojos, se llevó a cabo la determinación de la formación de malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la peroxidación lipídica, por lo que su detección es indicativa de que ha habido un daño oxidativo en las células. Para ello se eligieron las condiciones propuestas por Cesquini y col.<sup>207</sup> forzándose la peroxidación lipídica de la membrana de los glóbulos rojos.

Los compuestos ensayados fueron el hidroxitirosol y sus alquil éteres derivados descritos en la presente Memoria (107-116).

Previo al comienzo del experimento, los glóbulos rojos fueron resuspendidos en PBS (phosphate-buffered saline) junto con distintas concentraciones de los compuestos objeto del estudio, que fueron de 40 y 80  $\mu\text{M}$ , y se preincubaron a 37°C durante 15 minutos en agitación y ausencia de

luz. Para impedir posibles interacciones entre los polifenoles y el agente oxidante, el medio se cambió antes de iniciar el protocolo.

A continuación, una suspensión de glóbulos rojos en PBS en presencia de los alquil éteres de hidroxitirosol ensayados y *t*-butilhidroperóxido (1mM) se incubó durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 25% (p/v) a 1 mL de la suspensión antes descrita y se centrifugó a 1100 g durante 5 minutos. Una alícuota del sobrenadante fue utilizada para determinar el contenido en malondialdehído (MDA), producto que se forma, junto a otros, durante el proceso de oxidación de lípidos, y que se usa para la determinación de la oxidación de éstos. Para ello, a 1 mL de dicho sobrenadante se le añadió 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA), dando lugar a las moléculas de MDA, también llamadas TBARS (sustancias reactivas a TBA), que presentan un color rosado. La mezcla se llevó a ebullición durante 15 minutos y transcurrido este tiempo, se determinó la absorbancia a 532nm. Como medida de la peroxidación lipídica se utilizó la formación de sustancias reactivas a TBA (TBARS), cuya concentración se determinó empleando un valor de coeficiente de extinción molar,  $\epsilon$ , en la ecuación de Lambert-Beer ( $A = \epsilon bc$ ) de  $156\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 532 nm.

#### ***4.7.3. Determinación de la Hemólisis Oxidativa***

Las condiciones elegidas para llevar a cabo la lisis oxidativa de la membrana de los glóbulos rojos son las recogidas por Ko y col.<sup>208</sup>. Para ello, una solución 80 mM de dihidrocloruro AAPH en PBS fue añadida a una suspensión de glóbulos rojos en PBS al 10% v/v. Al igual que en el apartado anterior, los glóbulos rojos fueron preincubados con distintas concentraciones de los compuestos a estudiar (40 y 80  $\mu\text{M}$ ) a 37°C durante 15 minutos en las mismas condiciones de agitación y ausencia de luz. Una vez añadido el reactivo AAPH, la mezcla se agitó a 37°C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, el porcentaje de hemólisis se determinó espectrofotométricamente a 540 nm. Para ello, una dilución 1:20 de la mezcla de reacción en PBS se



centrifugó a 1000 g durante 10 minutos y se leyó la absorbancia *A* del sobrenadante. A continuación, otra dilución 1:20 de la mezcla de reacción, esta vez en agua destilada fría para provocar la lisis total de las células, fue igualmente centrifugada y se leyó la absorbancia *B* del sobrenadante a 540 nm, de manera que el porcentaje de hemólisis fue calculado a partir de la relación de las dos lecturas realizadas.

$$\% \text{ hemólisis} = (A/B) \times 100$$

#### 4.8. Evaluación de la citotoxicidad mediante la técnica colorimétrica MTT

Se trata de una técnica colorimétrica que se basa en la capacidad de las células viables para reducir un compuesto llamado *MTT* (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolina) a un compuesto coloreado e insoluble denominado *formazan-MTT*. Este compuesto es posteriormente solubilizado y cuantificado mediante absorbancia, de manera que a mayor absorbancia, mayor producción del complejo *formazan-MTT* y, por tanto, mayor número de células vivas. Estos ensayos se llevaron a cabo para estudiar la citotoxicidad comparada de los nuevos alquil éteres de hidroxitirosol sintetizados sobre células sanas (células MRC-5 y MCF-10) y células de adenocarcinoma (de pulmón, de colon y de mama) y comprobar de esta manera la posible citotoxicidad selectiva de dichos compuestos.

Las líneas celulares empleadas fueron:

- a) Células humanas de adenocarcinoma de colon en grado II HT-29 (European Collection of Cell Cultures) cultivadas en medio McCoy's suplementado con 10% suero fetal bovino, 2 mM glutamina y 50 µg/mL tanto de penicilina como de estreptomicina. Fueron incubadas a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub>.

- b) Células humanas de adenocarcinoma pulmonar A-549 (European Collection of Cell Cultures) cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM de glutamina y 100  $\mu$ L tanto de estreptomycin como de penicilina. Se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>.
- c) Células humanas de adenocarcinoma de mama MCF-7 (European Collection of Cell Cultures) cultivadas en medio DMEM suplementado con 0,01 mg/mL de insulina bovina, 2 mM de glutamina, 50  $\mu$ g/mL de penicilina, 50  $\mu$ g/mL de estreptomycin y 10% de suero bovino fetal. Se cultivaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>.

Por otro lado, se emplearon células sanas MRC-5 de fibroblastos y MCF-10 de mama (European Collection of Cell Cultures) que fueron cultivadas en medio DMEM suplementado de igual manera que las anteriores. Fueron igualmente incubadas a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>.

#### ***4.8.1. Ensayo con células HT-29 de adenocarcinoma de colon***

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 8 x 10<sup>4</sup> células/mL, tomando 90  $\mu$ L por pocillo. 24 horas tras la siembra se añaden los compuestos a ensayar en las siguientes concentraciones: 100, 50, 25 y 12,5  $\mu$ g/mL. Los compuestos ensayados fueron; hidroxitirosol (**1**) y metil (**107**), etil (**108**), butil (**110**), octil (**112**) y dodecil (**114**) hidroxitirosol.

Tras 48 horas de tratamiento se retiró el medio de los pocillos para eliminar la posible absorbancia que pudieran producir los compuestos ensayados, y se lavaron añadiendo aproximadamente 80  $\mu$ L de medio a cada pocillo que luego se retiró. Tras este proceso se añadieron 125  $\mu$ L de la solución de MTT (5mg/mL en medio) a cada pocillo. Pasadas 5 horas el MTT es metabolizado por las células viables y se observa el precipitado que forma el complejo *Formazan-MTT*. Para la disolución de dicho precipitado se añadieron 80  $\mu$ L de dodecilsulfato sódico (SDS, 20% al 0,02 de HCl) a cada pocillo durante 10 horas

y posteriormente se leyó la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro automático de placas Multiskan Ex. Mod. 355 (Labsystems). La viabilidad celular se presenta como el porcentaje respecto al control. Los datos se muestran como la media de al menos tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

#### **4.8.2. Ensayo con células A-549 de adenocarcinoma de pulmón**

Se sembraron las células en placas de 96 pocillos ( $9 \times 10^3$  células/pocillo en 100  $\mu$ L para las células MRC-5 y  $4,5 \times 10^3$  células/pocillo en 100  $\mu$ L para las células A549), incubándose 24 horas, tras las cuales, se añadieron los compuestos a ensayar en distintas concentraciones que fueron de 10, 32, 100, 320 y 1000  $\mu$ M para el hidroxitirosol (**1**); 10, 32, 100 y 320  $\mu$ M para el etil hidroxitirosol (**108**) y de 1, 3, 10, 32 y 100  $\mu$ M para el octil (**112**), dodecil (**114**) y hexadecil hidroxitirosol (**115**).

Como control positivo selectivo se utilizó  $H_2O_2$  (1-1000  $\mu$ M) y como control positivo no selectivo se empleó HCl (12,5-25  $\mu$ M). Estos controles se utilizan para comprobar que las células que se emplean no son sensibles a cualquier sustancia, de manera que el control selectivo positivo sólo mata a las células cancerosas, mientras que el no selectivo mata tanto a las células cancerosas como a las sanas. Una vez finalizado el tratamiento, se retiró el medio y se incubaron las células durante 5 horas con 125  $\mu$ L de MTT (1 mg/mL en medio de cultivo). Tras este tiempo, se añadieron 80  $\mu$ L de SDS 20% en 0,02 M HCl para solubilizar los cristales de *formazan*-MTT y se dejó incubar 10 horas. Finalmente, se realizó la lectura de las placas en un lector de placas a 540 nm. La viabilidad celular fue expresada en porcentaje con respecto al control. Los resultados se expresaron como medias de al menos tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

#### ***4.8.3. Ensayo con células MCF-7 de adenocarcinoma de mama***

La proliferación celular, como en los ensayos anteriores, fue evaluada mediante la técnica *MTT*. Se cultivaron un total de  $9 \times 10^3$  células/mL de células sanas MCF10 y de  $7 \times 10^3$  células/mL de células de adenocarcinoma de mama MCF7 en placas de 96 pocillos durante 24 horas. Pasado este tiempo, se añadieron los compuestos a ensayar al cultivo, que en este caso fueron el hidroxitirosol (**1**) en concentraciones de 10, 32, 100 y 320  $\mu\text{M}$  y el dodecil hidroxitirosol (**114**) en concentraciones de 1, 3, 10, 32 y 100  $\mu\text{M}$ . Como control positivo selectivo se utilizó  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1-1000  $\mu\text{M}$ ) y como control positivo no selectivo se empleó HCl (12,5-25  $\mu\text{M}$ ). Tras 48 horas de tratamiento se retiró el medio, se añadieron 125  $\mu\text{L}$  de *MTT* y se incubó durante 4 horas. A continuación, se añadieron 80  $\mu\text{L}$  de SDS 20% en 0,02 M de HCl y se volvió a incubar durante otras 4 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se midió la densidad óptica por espectrofotometría de cada pocillo a 540nm para evaluar la viabilidad celular. Los resultados se expresaron como medias de al menos tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).



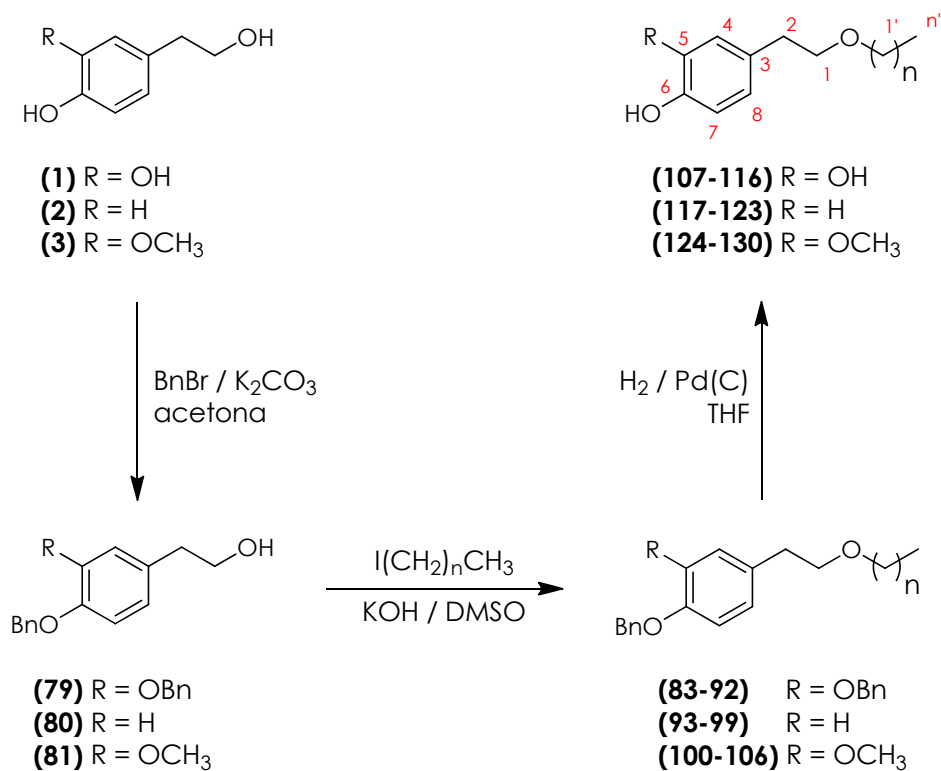
## ***5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Preparación y caracterización de éteres alquílicos derivados de compuestos fenólicos presentes en el olivo

La síntesis de los alquil éteres objeto de estudio, se ha llevado a cabo en tres etapas; en la primera de ellas se ha procedido a la protección de los *OH* fenólicos, en forma de bencil éteres, con el fin de evitar que reaccionen en el siguiente paso. Una segunda etapa en la que se procede a la introducción de una cadena alquílica, de longitud variable, en el *OH* alcohólico libre, mediante el uso de los ioduros de alquilo correspondientes como agentes alquilantes. Por último, la etapa final ha consistido en la desprotección de los *OH* fenólicos, mediante la hidrogenólisis de los grupos bencilo, obteniéndose los correspondientes alquil éteres de hidroxitirosol, tirosol y alcohol homovanílico libres (esquema 12).



**Esquema 12.** Esquema general para la síntesis de los nuevos compuestos.



En el esquema 12 se recogen las diferentes etapas en las que se ha llevado a cabo la síntesis de los nuevos compuestos, habiéndose obtenido un total de 48 nuevas sustancias. Los rendimientos químicos obtenidos tanto de los productos protegidos como desprotegidos una vez aislados y purificados, se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3.** Rendimientos químicos de los compuestos aislados **83-130**.

<b>Compuesto</b>	<b>Rto (%)</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Rto (%)</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Rto (%)</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Rto (%)</b>
<b>83</b>	87	<b>95</b>	77	<b>107</b>	79	<b>119</b>	67
<b>84</b>	85	<b>96</b>	80	<b>108</b>	82	<b>120</b>	74
<b>85</b>	60	<b>97</b>	68	<b>109</b>	80	<b>121</b>	78
<b>86</b>	82	<b>98</b>	87	<b>110</b>	81	<b>122</b>	80
<b>87</b>	80	<b>99</b>	82	<b>111</b>	79	<b>123</b>	77
<b>88</b>	63	<b>100</b>	84	<b>112</b>	80	<b>124</b>	81
<b>89</b>	89	<b>101</b>	84	<b>113</b>	80	<b>125</b>	75
<b>90</b>	89	<b>102</b>	80	<b>114</b>	81	<b>126</b>	72
<b>91</b>	84	<b>103</b>	73	<b>115</b>	78	<b>127</b>	78
<b>92</b>	80	<b>104</b>	75	<b>116</b>	74	<b>128</b>	80
<b>93</b>	79	<b>105</b>	70	<b>117</b>	81	<b>129</b>	83
<b>94</b>	75	<b>106</b>	80	<b>118</b>	82	<b>130</b>	81

Como se puede observar en dicha tabla, los rendimientos medios obtenidos en todos los casos varían desde aceptables (60%) hasta excelentes (89%).

Todas las nuevas sustancias obtenidas han sido caracterizadas tanto por sus puntos de fusión (sólidos), como por sus espectros de IR, RMN y EM, así como por sus análisis elementales. Su determinación estructural se ha realizado fundamentalmente en base a la aplicación de diversas experiencias de RMN (COSY, NOESY, HSQC, HMBC), habiéndose asignado de forma inequívoca todas las señales que aparecen en sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN.

### 5.1.1. Caracterización de los alquil éteres derivados de hidroxitirosol

#### 5.1.1.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

En las tablas 4-7 se presentan los datos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN de los derivados protegidos y desprotegidos de hidroxitirosol. Todas las señales han sido inequívocamente asignadas en base a experimentos 2D homo- (COSY, NOESY) y heteronuclear (HSQC y HMBC). De manera general, y tomando como modelo a los correspondientes etil derivados, se puede apreciar cómo la funcionalización del OH alcohólico presente en el dibencil hidroxitirosol con la cadena alquílica da lugar a la aparición de señales a desplazamientos químicos correspondientes a la región alifática del espectro. Así, como se puede observar en la figura 8, aparecen un cuartete y un triplete a desplazamientos químicos de 3,39 ppm y 1,07 ppm respectivamente que corresponden a la cadena  $\text{CH}_2\text{CH}_3$  que se ha introducido.

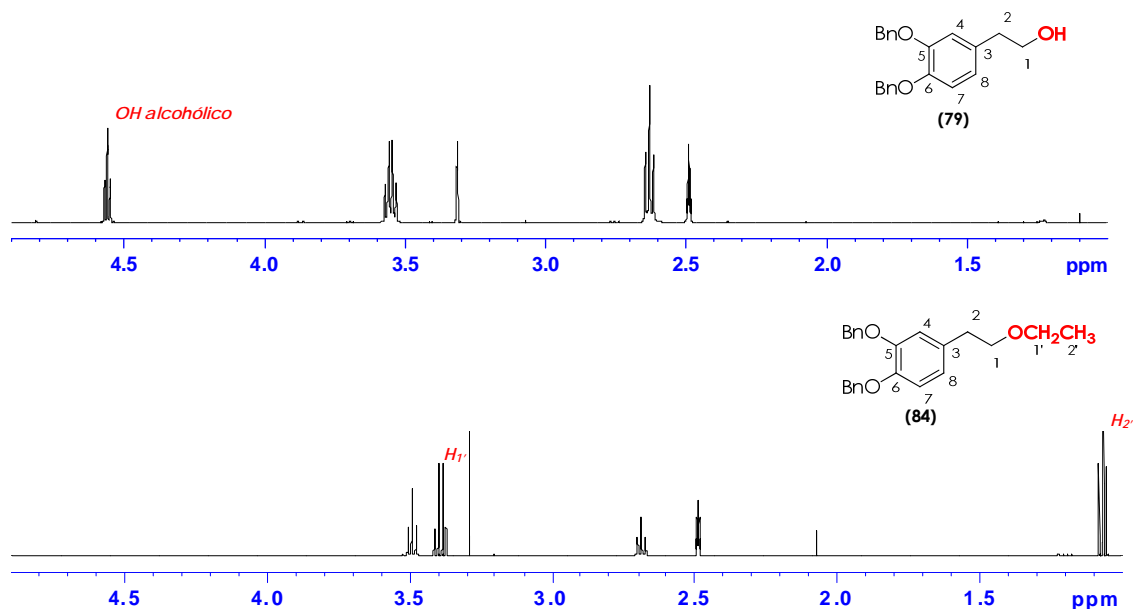
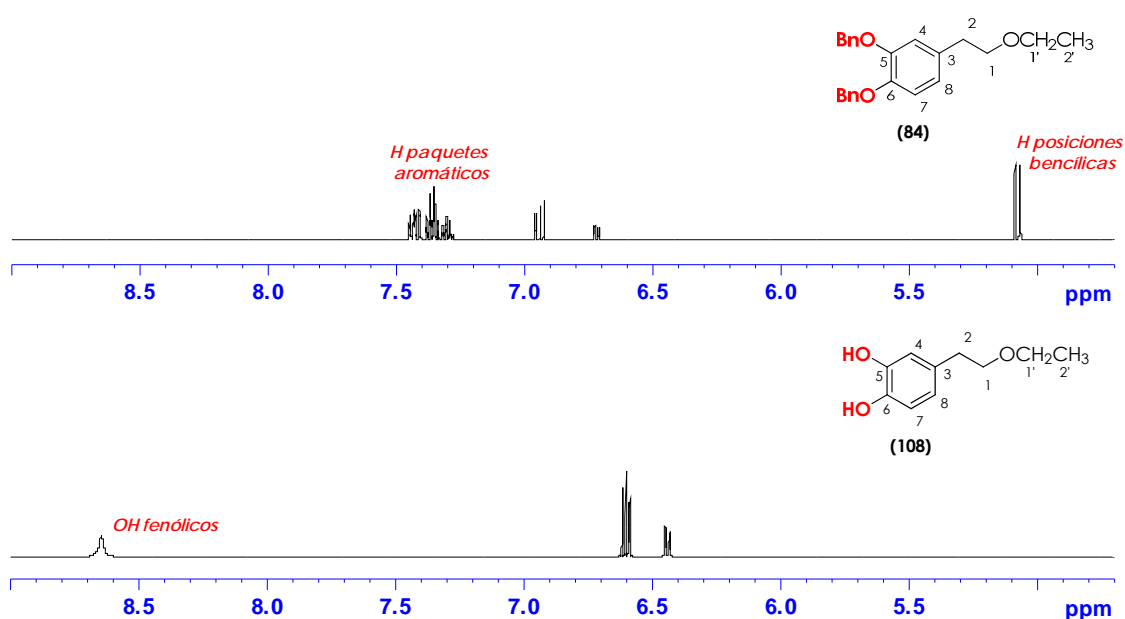


Figura 8. Comparación de señales en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos **79** y **84**.

Por otro lado, tal y como se muestra en la figura 9, la desprotección de los OH fenólicos que da lugar al compuesto **108**, origina la aparición de una señal singulete a un desplazamiento químico de 8,5 ppm aproximadamente. La

aparición de esta señal viene acompañada por la desaparición de las señales correspondientes al paquete de protones aromáticos de los grupos bencilo, que se localizan en un rango de desplazamiento químico de entre 7,3 y 7,5 ppm. Además también desaparecen los singuletes que corresponden a los protones metilénicos de dichos grupos protectores y que estaban localizados a desplazamientos químicos de 5,09 y 5,07 ppm. Por último, indicar que se observa un desplazamiento a campo alto de los protones aromáticos H<sub>4</sub>, H<sub>7</sub> y H<sub>8</sub> al desaparecer los grupos bencilícos de las posiciones adyacentes.



**Figura 9.** Comparación de señales en los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de los compuestos **84** y **108**.

Tabla 4. Datos de  $^1\text{H-NMR}$  (500,13 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , 303K) para los compuestos 83-92. Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz).

	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
Unidad fenética										
1	3.45 (t) ( $J_{1,2} = 7.0$ )	3.49 (t) ( $J_{1,2} = 7.0$ )	3.49 (t) ( $J_{1,2} = 7.0$ )	3.49 (t) ( $J_{1,2} = 7.0$ )	3.49 (t) ( $J_{1,2} = 6.9$ )	3.49 (t) ( $J_{1,2} = 7.0$ )	3.49 (t) ( $J_{1,2} = 7.0$ )	3.49 (t) ( $J_{1,2} = 7.0$ )	3.49 (t) ( $J_{1,2} = 7.0$ )	3.49 (t) ( $J_{1,2} = 7.0$ )
2	2.89 (t)	2.89 (t)	2.89 (t)	2.89 (t)	2.89 (t)	2.89 (t)	2.89 (t)	2.89 (t)	2.89 (t)	2.89 (t)
4	6.96 (d) ( $J_{1,2} = 2.0$ )	6.96 (d) ( $J_{1,2} = 2.0$ )	6.96 (d) ( $J_{1,2} = 2.0$ )	6.96 (d) ( $J_{1,2} = 2.0$ )	6.96 (d) ( $J_{1,2} = 2.0$ )	6.96 (d) ( $J_{1,2} = 2.0$ )	6.96 (d) ( $J_{1,2} = 2.0$ )	6.96 (d) ( $J_{1,2} = 2.0$ )	6.96 (d) ( $J_{1,2} = 2.0$ )	6.96 (d) ( $J_{1,2} = 2.0$ )
7	6.93 (d) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.93 (d) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.93 (d) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.93 (d) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.93 (d) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.93 (d) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.93 (d) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.93 (d) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.93 (d) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.93 (d) ( $J_{1,2} = 8.2$ )
8	6.72 (dd) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.72 (dd) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.72 (dd) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.72 (dd) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.72 (dd) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.72 (dd) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.72 (dd) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.72 (dd) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.72 (dd) ( $J_{1,2} = 8.2$ )	6.72 (dd) ( $J_{1,2} = 8.2$ )
Cadena alifática										
1°	3.21 (t)	3.39 (t) ( $N = 7.0$ )	3.30 (t) ( $N = 6.9$ )	3.33 (t) ( $N = 6.3$ )	3.32 (t) ( $N = 6.3$ )	3.33 (t) ( $N = 6.3$ )	3.33 (t) ( $N = 6.3$ )	3.33 (t) ( $N = 6.3$ )	3.33 (t) ( $N = 6.3$ )	3.33 (t) ( $N = 6.3$ )
2°		1.07 (t) ( $N = 7.0$ )	1.47 (m)	1.44 (m)	1.43 (m)	1.45 (m)	1.43 (m)	1.45 (m)	1.45 (m)	1.46 (m)
3°			0.83 (t) ( $N = 7.4$ )	1.28 (m)	1.24 (m)	1.23 (m)	1.23 (m)	1.23 (m)	1.23 (m)	1.22 (m)
4°			0.85 (t) ( $N = 7.0$ )							
5°										
6°					0.84 (t) ( $N = 7.0$ )					
7°						0.84 (t) ( $N = 7.0$ )				
8°										
9°										
10°							0.63 (t) ( $N = 7.0$ )			
11°										
12°								0.84 (t) ( $N = 7.0$ )		
13°										
14°										
15°										
16°										
17°									0.84 (t) ( $N = 7.0$ )	
18°										0.84 (t) ( $N = 7.0$ )
Grupos bencilo										
CHen 5	6.09 (t)	6.09 (t)	6.09 (t)	6.09 (t)	6.08 (t)	6.09 (t)	6.09 (t)	6.09 (t)	6.09 (t)	6.09 (t)
CHen 6	5.07 (t)	5.07 (t)	5.07 (t)	5.07 (t)	5.07 (t)	5.07 (t)	5.07 (t)	5.07 (t)	5.07 (t)	5.07 (t)
2xPh	7.37 (m)	7.37 (m)	7.37 (m)	7.37 (m)	7.37 (m)	7.37 (m)	7.37 (m)	7.37 (m)	7.37 (m)	7.37 (m)

Tabla 5. Datos de  $^1\text{H-RMN}$  (500,13 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 303K) para los compuestos 107-116. Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento (J, Hz).

	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116
Unidad fenólica										
1	3,42 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	3,46 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,46 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,44 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,44 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,44 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,44 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,44 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,44 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,46 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )
2	2,60 (t) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	2,60 (t) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	2,60 (t) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	2,60 (t) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	2,60 (t) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	2,60 (t) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	2,60 (t) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	2,60 (t) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	2,60 (t) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	2,60 (t) ( $J_{1,3} = 2,1$ )
4	6,88 (d) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	6,88 (d) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	6,88 (d) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	6,88 (d) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	6,88 (d) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	6,88 (d) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	6,88 (d) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	6,88 (d) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	6,88 (d) ( $J_{1,3} = 2,1$ )	6,88 (d) ( $J_{1,3} = 2,1$ )
7	6,60 (d) ( $J_{1,3} = 8,0$ )	6,60 (d) ( $J_{1,3} = 8,0$ )	6,60 (d) ( $J_{1,3} = 8,0$ )	6,60 (d) ( $J_{1,3} = 8,0$ )	6,60 (d) ( $J_{1,3} = 8,0$ )	6,60 (d) ( $J_{1,3} = 8,0$ )	6,60 (d) ( $J_{1,3} = 8,0$ )	6,60 (d) ( $J_{1,3} = 8,0$ )	6,60 (d) ( $J_{1,3} = 8,0$ )	6,60 (d) ( $J_{1,3} = 8,0$ )
8	6,43 (dd)	6,44 (dd)	6,44 (dd)	6,43 (dd)	6,44 (dd)	6,43 (dd)	6,43 (dd)	6,43 (dd)	6,43 (dd)	6,44 (dd)
Cadena alquílica										
1'	3,21 (s)	3,40 (c) ( $J_{1,2} = 6,4$ )	3,34 (t) ( $J_{1,2} = 6,4$ )	3,33 (t) ( $J_{1,2} = 6,4$ )	3,34 (t) ( $J_{1,2} = 6,4$ )	3,33 (t) ( $J_{1,2} = 6,4$ )	3,33 (t) ( $J_{1,2} = 6,4$ )	3,33 (t) ( $J_{1,2} = 6,4$ )	3,33 (t) ( $J_{1,2} = 6,4$ )	3,33 (t) ( $J_{1,2} = 6,4$ )
2'		1,08 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	1,48 (m)	1,45 (m)	1,45 (m)	1,45 (m)	1,41 (m)	1,45 (m)	1,45 (m)	1,45 (m)
3'			0,83 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	1,24 (m)	1,24 (m)	1,23 (m)	1,24 (m)	1,23 (m)	1,23 (m)	1,23 (m)
4'										
5'										
6'				0,86 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )						
7'										
8'										
9'				0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )						
10'										
11'										
12'								0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )		
13'										
14'										
15'										
16'									0,86 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	
17'										
18'										
OH en pos. 5	8,61 (s)	8,46 (s)	8,60 (s)	8,66 (s)	8,46 (s)	8,60 (s)	8,66 (s)	8,66 (s)	8,66 (s)	8,66 (s) ( $J = 7,0$ )
OH en pos. 6	8,61 (s)	8,46 (s)	8,60 (s)	8,62 (s)	8,65 (s)	8,60 (s)	8,63 (s)	8,63 (s)	8,63 (s)	8,63 (s)

Tabla 6. Datos de  $^{13}\text{C}$ -RMN (125,75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 303 K) para los compuestos 88-92. Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm).

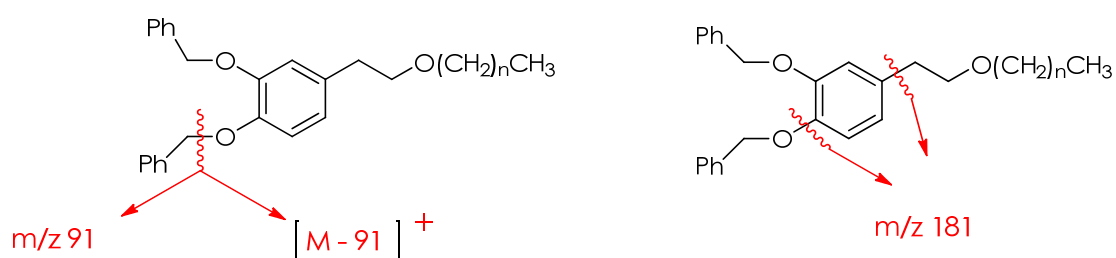
	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
Unidad fenético										
1	72,9	70,7	70,9	71,0	71,0	71,0	70,9	70,9	70,9	70,9
2	34,8	35,1	35,1	35,1	35,1	35,1	35,0	35,1	35,1	35,0
3	132,1	132,2	132,2	132,2	132,3	132,2	132,2	132,3	132,3	132,3
4	115,4	115,4	115,5	115,4	115,5	115,4	115,4	115,4	115,5	115,5
5	148,1	148,1	148,1	148,1	148,1	148,1	148,1	148,1	148,1	148,1
6	146,6	146,6	146,6	146,6	146,6	146,6	146,6	146,6	146,6	146,6
7	114,7	114,7	114,7	114,7	114,7	114,7	114,6	114,6	114,7	114,6
8	121,3	121,3	121,3	121,3	121,3	121,3	121,2	121,3	121,3	121,3
Cadena alquílica										
1'	57,7	65,1	71,5	69,6	69,9	69,9	69,8	69,9	69,8	69,8
2'		16,0	22,4	31,3	29,1	29,1	29,1	29,1	29,1	29,1
3'			10,4	18,8	23,7	23,6	23,6	23,6	23,6	23,6
4'				13,7	31,0	29,0-28,6	29,0-28,6	29,0-28,6	29,0-28,6	29,0-28,6
5'					22,0	"	"	"	"	"
6'					13,6	31,2	"	"	"	"
7'						22,0	"	"	"	"
8'						13,8	31,2	"	"	"
9'							22,0	"	"	"
10'							13,5	31,2	"	"
11'								22,0	"	"
12'									31,2	"
13'										13,8
14'										
15'										
16'										
17'										
18'										
Grupo benzilo en 5										
$\text{CH}_2$ (1'')	70,1	70,1	70,1	70,1	70,1	70,1	70,1	70,1	70,1	70,1
2''	137,4	137,4	137,3	137,4	137,4	137,3	137,3	137,3	137,3	137,3
3''	127,4	127,4	127,4	127,4	127,4	127,4	127,4	127,4	127,4	127,4
4''	128,3	128,3	128,2	128,3	128,3	128,2	128,2	128,2	128,2	128,2
5''	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6
Grupo benzilo en 6										
$\text{CH}_2$ (1''')	70,3	70,2	70,2	70,2	70,3	70,2	70,2	70,3	70,2	70,2
2'''	137,5	137,5	137,4	137,5	137,5	137,4	137,4	137,4	137,4	137,4
3'''	127,4	127,4	127,4	127,4	127,4	127,4	127,4	127,4	127,4	127,4
4'''	128,3	128,3	128,2	128,3	128,3	128,2	128,2	128,2	128,2	128,2
5'''	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6

Tabla 7. Datos de  $^{13}\text{C}$ -RMN [125,75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 303K] para los compuestos 107-116. Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm).

	107	108	109	110	111	112	113	114	116	116
Unidad fenético										
1	23,2	71,1	71,3	71,4	71,4	71,4	71,4	71,4	71,4	71,4
2	34,7	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	34,9	35,0	35,0	35,0
3	129,7	129,7	129,7	129,7	129,7	129,7	129,7	129,7	129,7	129,7
4	116,2	116,2	116,2	116,2	116,2	116,1	116,1	116,1	116,1	116,1
5	144,9	144,9	144,9	144,9	144,9	144,8	144,8	144,8	144,8	144,8
6	143,4	143,2	143,3	143,3	143,3	143,3	143,3	143,3	143,3	143,3
7	115,3	115,3	115,3	115,3	115,3	115,3	115,3	115,3	115,3	115,3
8	119,3	119,3	119,3	119,3	119,3	119,3	119,3	119,3	119,3	119,3
Cadena alquímica										
1'	67,7	65,1	71,6	69,6	69,9	69,9	69,9	69,9	69,9	69,9
2'		15,0	22,4	31,3	29,1	29,1	29,1	29,1	29,1	29,2
3'			10,5	18,8	25,5	25,5	25,5	25,5	25,5	25,5
4'				13,7	31,0	30,7	29,0-29,6	29,0-29,6	29,0-29,6	29,0-29,6
5'					32,0	32,6	"	"	"	"
6'					13,8	31,2	"	"	"	"
7'						22,0	"	"	"	"
8'						13,0	"	"	"	"
9'							31,2	"	"	"
10'							22,0	"	"	"
11'							13,8	"	"	"
12'								31,2	"	"
13'								22,0	"	"
14'								13,8	"	"
15'									31,2	"
16'									22,0	"
17'										31,2
18'										22,0
										13,8

## 5.1.1.2. Espectrometría de masas (EM)

En cuanto a los datos obtenidos en sus correspondientes espectros de masas, se puede observar una serie de picos característicos que corroboran la estructura propuesta en cada caso. En este sentido, se observa en todos los alquil éteres protegidos de hidroxitirosol (**83-92**) el pico atribuible al ión molecular,  $[M]^+$ , que se corresponde con la masa de cada compuesto que se analiza, con una intensidad relativa variable. Este ión es de baja o media intensidad en estos compuestos debido a la presencia de grupos bencilo en sus estructuras, los cuales originan con gran facilidad el ión tropilio ( $m/z$  91), muy estable, siendo en estos casos el pico base del espectro (100% de intensidad relativa). De hecho, es llamativa la ausencia de otros iones de intensidad reseñable en estos espectros, salvo los procedentes de fragmentaciones propias de la cadena alquílica en los homólogos superiores. No obstante, se ha encontrado en todos los casos un ión correspondiente a  $[M-91]^+$  de baja a muy baja abundancia relativa, así como un ión común con una relación  $m/z$  de 181 (cuya intensidad relativa varía entre el 4% y el 7%) que debe corresponder a la pérdida de uno de los dos grupos benciloxi presentes, seguida de una fragmentación de la cadena de alquiloxtirol (esquema 13).

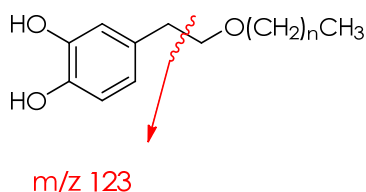


**Esquema 13.** Principales fragmentos observados en los espectros de masas de los compuestos **83-92**.

En los espectros de masas de los éteres libres (**107-116**) también se observa el ión molecular en cada caso, apareciendo en esta ocasión con una mayor abundancia relativa (entre el 23% y el 49%) debido a la ausencia de los grupos bencilo en sus estructuras. Además, como se ha comentado



anteriormente, el pico base del espectro es común a todos los compuestos, apareciendo a una relación  $m/z$  de 123. Este ión es equivalente al ión tropilio, formándose en esta ocasión por la ruptura del enlace  $\beta$  al grupo alcoxilo, tal como se indica en el esquema 14.

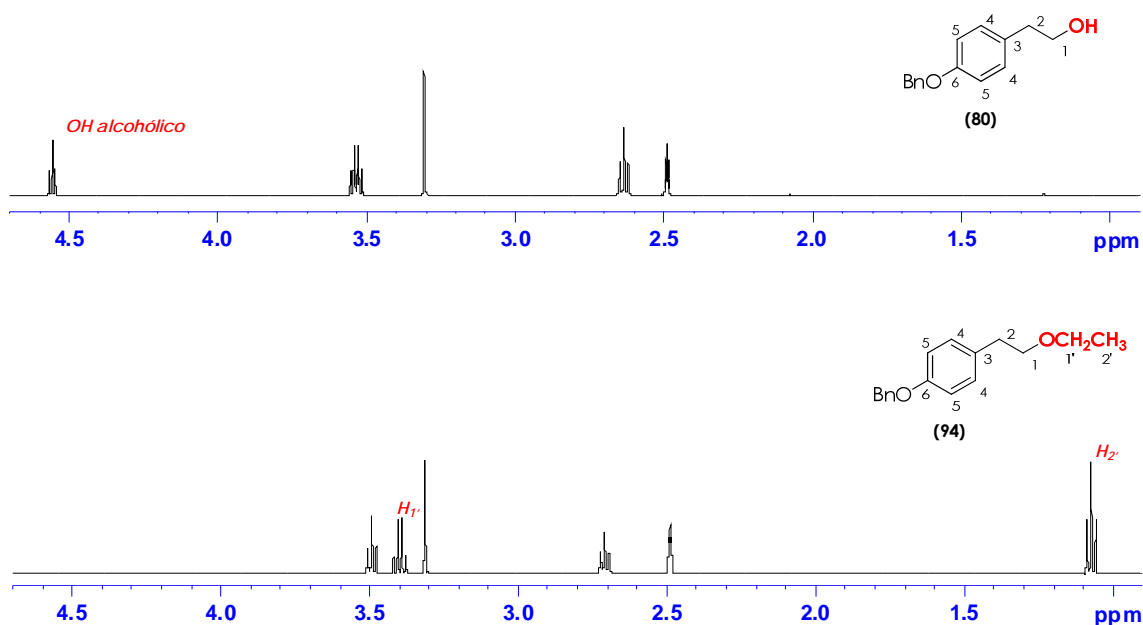


**Esquema 14.** Formación del pico base en los espectros de masas de los compuestos **103–112**.

### 5.1.2. Caracterización de los alquil éteres derivados de tirosol

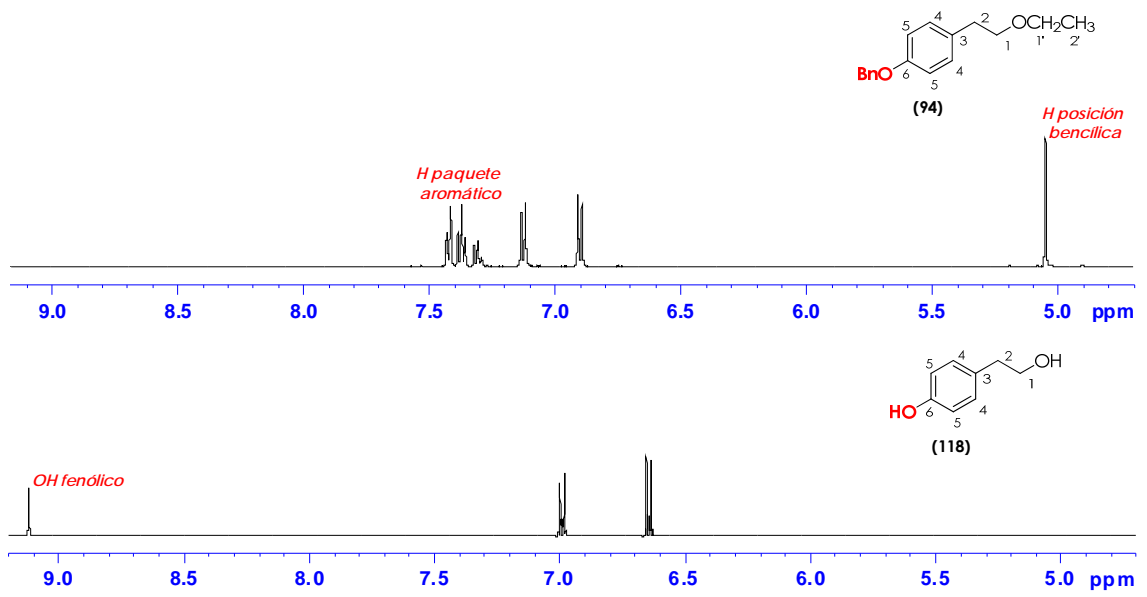
#### 5.1.2.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

En las tablas 8 y 9 se presentan los datos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN completamente asignados de los derivados protegidos y desprotegidos de tirosol. Al igual que con los derivados de hidroxitirosol, se toma como modelo el correspondiente etil derivado (**94**). Así, como se puede apreciar en la figura 10, la sustitución del  $\text{OH}$  alcohólico presente en el bencil tirosol (**80**) da lugar a la aparición de señales a desplazamientos químicos correspondientes a la región alifática del espectro, de manera que, para el compuesto **94**, a desplazamientos químicos de 3,39 ppm y 1,07 ppm aparecen un cuartete y un triplete, respectivamente, que corresponden a la cadena  $\text{CH}_2\text{CH}_3$  introducida.



**Figura 10.** Comparación de señales en los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de los compuestos **80** y **94**.

Por otro lado, tal y como se muestra en la figura 11, la desprotección del *OH* fenólico que da lugar al compuesto **118**, origina la aparición de una señal singulete a un desplazamiento químico de 9,1 ppm. La aparición de esta señal viene acompañada por la desaparición de las señales correspondientes al paquete de protones aromáticos del grupo bencilo, que se localizaban en un rango de desplazamiento químico de entre 7,3 y 7,5 ppm. Además también desaparece el singulete que correspondía a los protones metilénicos de dicho grupo protector y que estaban localizados a 5,05 ppm. Por último, indicar que se observa un desplazamiento a campo alto de los protones aromáticos, H<sub>4</sub> y H<sub>5</sub>, al desaparecer el grupo bencilo de la posición adyacente.



**Figura 11.** Comparación de señales en los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de los compuestos **94** y **118**.

Tabla B. Datos de  $^1\text{H-NMR}$  (500,13 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 303K) para los compuestos 93-99 y 117-123. Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz).

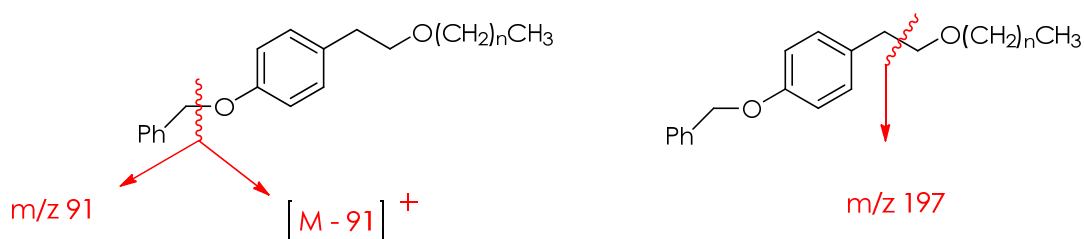
	93	94	95	96	97	98	99	117	118	119	120	121	122	123
Unidad fenilico														
1	3,46 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,49 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )	3,49 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,49 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	3,49 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,49 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,48 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,44 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	3,46 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,47 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,46 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,46 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )	3,46 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )	3,46 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )
2	2,71 (t) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	2,71 (t) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	2,71 (t) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	2,71 (t) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	2,70 (t) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	2,70 (t) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	2,70 (t) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	2,66 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	2,66 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	2,66 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	2,66 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	2,66 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	2,66 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	2,66 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )
4	7,12 (d) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	7,12 (d) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	7,12 (d) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	7,12 (d) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	7,12 (d) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	7,12 (d) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	7,12 (d) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	6,98 (d) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	6,99 (d) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	6,99 (d) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	6,99 (d) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	6,98 (d) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	6,98 (d) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	6,97 (d) ( $J_{1,2} = 6,9$ )
5	6,90 (d) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	6,90 (d) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	6,90 (d) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	6,90 (d) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	6,90 (d) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	6,89 (d) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	6,89 (d) ( $J_{1,2} = 6,7$ )	6,64 (d) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	6,64 (d) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	6,64 (d) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	6,64 (d) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	6,64 (d) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	6,64 (d) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	6,64 (d) ( $J_{1,2} = 6,9$ )
Cadena alquilo														
1'	3,21 (s)	3,31 (t) ( $J_{1,2} = 6,5$ )	3,31 (t) ( $J_{1,2} = 6,5$ )	3,34 (t) ( $J_{1,2} = 6,5$ )	3,33 (t) ( $J_{1,2} = 6,5$ )	3,33 (t) ( $J_{1,2} = 6,5$ )	3,33 (t) ( $J_{1,2} = 6,5$ )	3,21 (s)	3,39 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,30 (t) ( $J_{1,2} = 6,5$ )	3,34 (t) ( $J_{1,2} = 6,5$ )	3,33 (t) ( $J_{1,2} = 6,5$ )	3,33 (t) ( $J_{1,2} = 6,5$ )	3,32 (t) ( $J_{1,2} = 6,5$ )
2'	1,07 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	1,47 (m)	1,47 (m)	1,44 (m)	1,44 (m)	1,44 (m)	1,45 (m)	1,07 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	1,07 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	1,47 (m)	1,44 (m)	1,44 (m)	1,44 (m)	1,44 (m)
3'	0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	0,83 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	0,83 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	0,83 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	0,82 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	0,82 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )
4'														
5'														
6'					0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )							0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )		
7'														
8'						0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )							0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )	
9'														
10'														
11'														
12'														0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )
Grupos bandeo														
CH-en $\delta$	6,05 (s)	6,04 (s)	6,05 (s)	6,05 (s)	6,05 (s)	6,05 (s)	6,04 (s)							
Ph	7,37 (m)	7,37 (m)	7,37 (m)	7,37 (m)	7,37 (m)	7,37 (m)	7,37 (m)							
OH-en pos. $\delta$								9,09 (s)	9,11 (s)	9,09 (s)	9,09 (s)	9,08 (s)	9,08 (s)	9,08 (s)

**Tabla 9.** Datos de  $^{13}\text{C}$ -RMN (125,75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 303K) para los compuestos **93-99** y **117-123**. Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm).

	93	94	95	96	97	98	99	117	118	119	120	121	122	123
Unidad fenético														
1	72,9	71,1	71,0	71,1	71,0	71,0	71,0	73,1	71,1	71,3	71,3	71,3	71,3	71,3
2	34,4	34,7	34,6	34,6	34,6	34,6	34,6	34,4	34,7	34,7	34,7	34,7	34,7	34,7
3	131,1	131,1	131,1	131,1	131,1	131,1	131,1	128,9	128,9	128,9	128,9	128,9	128,9	128,9
4	129,7	129,5	129,6	129,6	129,6	129,6	129,6	129,5	129,5	129,5	129,5	129,5	129,5	129,5
5	114,5	114,5	114,4	114,4	114,4	114,4	114,4	114,9	114,9	114,9	114,9	114,8	114,8	114,8
6	156,6	156,6	156,6	156,6	156,6	156,6	156,6	155,4	155,4	155,4	155,4	155,4	155,4	155,4
Cadena alquílica														
1'	57,7	65,1	71,5	69,5	69,8	69,8	69,8	57,6	65,1	71,4	69,5	69,8	69,8	69,8
2'		15,0	22,3	31,2	29,1	29,1	29,0		15,0	22,3	31,2	29,1	29,1	29,1
3'			10,4	18,7	25,2	25,6	25,6			10,4	18,8	25,3	25,6	25,6
4'				13,6	31,0	28,7	29,0-28,5				13,7	31,0	28,7	28,9-28,6
5'					22,0	28,6	"					22,0	28,6	"
6'					13,8	31,1	"					13,8	31,2	"
7'						22,0	"					22,0	22,0	"
8'						13,8	"					13,8	13,8	"
9'							"							"
10'							31,2							31,2
11'							22,0							22,0
12'							13,8							13,8
Grupo bencilo en $\delta$														
$\text{CH}_2$ (1'')	69,1	69,1	69,1	69,1	69,0	69,0	69,0							
2''	137,2	137,2	137,2	137,2	137,2	137,2	137,2							
3''	127,5	127,5	127,4	127,5	127,4	127,4	127,4							
4''	128,3	128,3	128,3	128,3	128,3	128,3	128,2							
5''	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6	127,6							

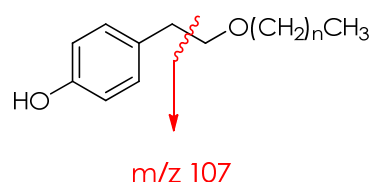
## 5.1.2.2. Espectrometría de masas (EM)

Para el caso de los derivados protegidos de tirosol (**93-99**), además de observarse el ión tropilio ( $m/z$  91) como pico base del espectro, el pico de baja intensidad correspondiente al ión  $m/z$   $[M-91]^+$  y el correspondiente ión molecular en todos los casos. Cabe destacar la presencia de un ión común a todos los derivados que presenta una relación  $m/z$  197. Éste se ha asignado al ión procedente de la fragmentación de la cadena de fenetilo, tal y como se indica en el esquema 15.



**Esquema 15.** Principales fragmentos observados en los espectros de masas de los compuestos **93-99**.

En el caso de los éteres derivados desprotegidos de tirosol (**117-123**), se observa igualmente el ión molecular correspondiente en todos sus espectros. Al igual que ocurre con los análogos de hidroxitirosol, el ión molecular tiene una intensidad relativa mayor a la de los derivados protegidos debido a la ausencia del grupo bencilo. Además se observa un pico base común para todos a  $m/z$  107, que corresponde, como se muestra en el esquema 16, con la ruptura del enlace  $\beta$  al grupo alcoxilo, de manera análoga a la encontrada en los derivados desprotegidos de hidroxitirosol (*apartado 5.1.1.2.*)

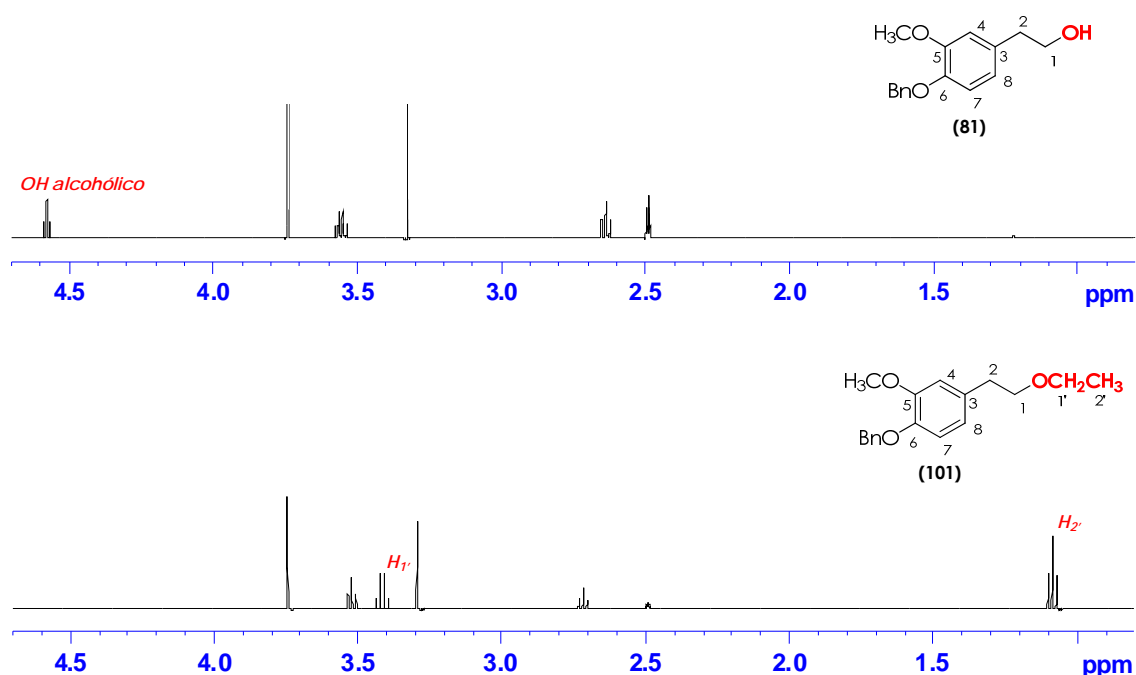


**Esquema 16.** Fragmentación principal en los espectros de masas de los compuestos **113-119**.

### 5.1.3. Caracterización de los alquil éteres derivados de alcohol homovanílico

#### 5.1.3.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

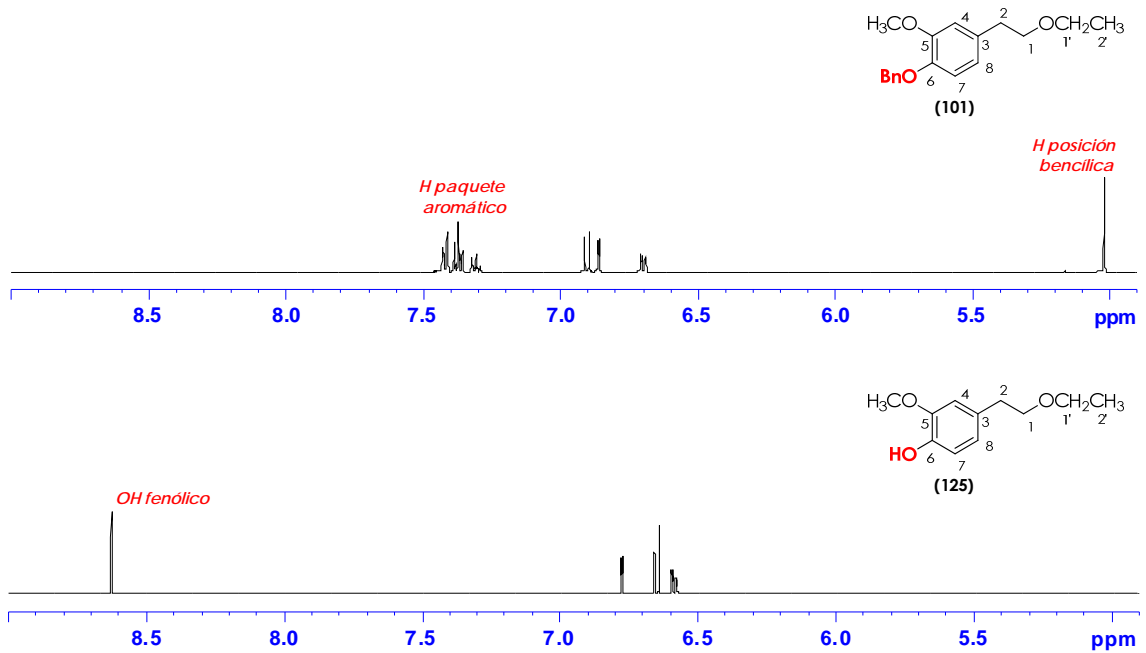
En las tablas 10 y 11 se presentan los datos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN completamente asignados de los derivados protegidos y desprotegidos de alcohol homovanílico. Al igual que con los derivados anteriores, se toma como modelo al correspondiente etil derivado. Así, tal y como se aprecia en la figura 12, la sustitución del OH alcohólico presente en el bencil derivado del alcohol homovanílico (**81**) por la cadena de etilo da lugar a la aparición de dos señales a desplazamientos químicos de 3,41 ppm y 1,08 ppm, un cuartete y un triplete, respectivamente, que corresponden con la cadena  $\text{CH}_2\text{CH}_3$  introducida en el compuesto **101**.



**Figura 12.** Comparación de señales en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos **81** y **101**.

Por otro lado, tal y como se muestra en la figura 13, la desprotección del OH fenólico que da lugar al etil éter del alcohol homovanílico libre (**125**), origina la aparición de una señal singulete a un desplazamiento químico de 8,6

ppm. La aparición de esta señal viene acompañada por la desaparición de las señales correspondientes al paquete de protones aromáticos del grupo bencilo, que se localiza a un desplazamiento químico de 7,37 ppm. Además también desaparece el singulete correspondiente a los protones de la posición bencílica, localizados a un desplazamiento químico de 5,02 ppm.



**Figura 13.** Comparación de señales en los espectros de <sup>1</sup>H de los compuestos **101** y **125** Tabla 10.



**Tabla 10.** Datos de  $^1\text{H-RMN}$  (500,13 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , 303K) para los compuestos **100-106** y **124-130**. Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz).

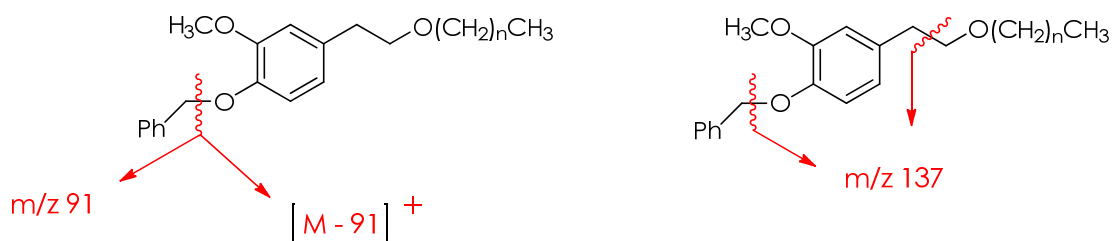
	100	101	102	103	104	105	106	124	125	126	127	128	129	130	
Unidad fenililo															
1	3,49 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	3,52 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	3,51 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	3,51 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,51 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	3,51 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,51 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	3,46 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )	3,49 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,49 (t) ( $J_{1,2} = 7,2$ )	3,49 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )	3,49 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )	3,48 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )	3,48 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )	
2	2,71 (t) ( $J_{4,5} = 2,0$ )	2,71 (t) ( $J_{4,5} = 1,9$ )	2,71 (t) ( $J_{4,5} = 1,8$ )	2,71 (t) ( $J_{4,5} = 1,9$ )	2,71 (t) ( $J_{4,5} = 1,8$ )	2,70 (t) ( $J_{4,5} = 1,9$ )	2,71 (t) ( $J_{4,5} = 1,9$ )	2,68 (t) ( $J_{4,5} = 1,9$ )	2,67 (t) ( $J_{4,5} = 1,9$ )	2,67 (t) ( $J_{4,5} = 1,8$ )	2,67 (t) ( $J_{4,5} = 1,9$ )	2,66 (t) ( $J_{4,5} = 1,9$ )	2,66 (t) ( $J_{4,5} = 1,7$ )	2,66 (t) ( $J_{4,5} = 1,9$ )	
4	6,85 (d) ( $J_{7,8} = 2,0$ )	6,86 (d) ( $J_{7,8} = 1,9$ )	6,85 (d) ( $J_{7,8} = 1,8$ )	6,85 (d) ( $J_{7,8} = 1,9$ )	6,85 (d) ( $J_{7,8} = 1,8$ )	6,85 (d) ( $J_{7,8} = 1,9$ )	6,85 (d) ( $J_{7,8} = 1,9$ )	6,76 (d) ( $J_{7,8} = 1,9$ )	6,77 (d) ( $J_{7,8} = 1,9$ )	6,78 (d) ( $J_{7,8} = 1,8$ )	6,77 (d) ( $J_{7,8} = 1,9$ )	6,77 (d) ( $J_{7,8} = 1,9$ )	6,77 (d) ( $J_{7,8} = 1,7$ )	6,77 (d) ( $J_{7,8} = 1,9$ )	
7	6,90 (d) ( $J_{7,8} = 8,1$ )	6,90 (d) ( $J_{7,8} = 7,9$ )	6,90 (d) ( $J_{7,8} = 8,1$ )	6,90 (d) ( $J_{7,8} = 8,1$ )	6,89 (d) ( $J_{7,8} = 8,1$ )	6,89 (d) ( $J_{7,8} = 8,1$ )	6,89 (d) ( $J_{7,8} = 8,2$ )	6,65 (d) ( $J_{7,8} = 7,9$ )	6,65 (d) ( $J_{7,8} = 7,9$ )	6,64 (d) ( $J_{7,8} = 7,9$ )	6,65 (d) ( $J_{7,8} = 7,9$ )	6,64 (d) ( $J_{7,8} = 7,9$ )	6,64 (d) ( $J_{7,8} = 7,9$ )	6,64 (d) ( $J_{7,8} = 7,9$ )	
8	6,69 (dd)	6,69 (dd)	6,69 (dd)	6,69 (dd)	6,69 (dd)	6,69 (dd)	6,68 (dd)	6,58 (dd)	6,58 (dd)	6,58 (dd)	6,58 (dd)	6,58 (dd)	6,57 (dd)	6,57 (dd)	
O Me en pos. 5	3,74 (s)	3,74 (s)	3,74 (s)	3,74 (s)	3,74 (s)	3,74 (s)	3,74 (s)	3,72 (s)	3,72 (s)	3,72 (s)	3,72 (s)	3,72 (s)	3,72 (s)	3,72 (s)	
Cadena alquilo															
1'	3,22 (s)	3,41 (c) ( $J = 7,0$ )	3,32 (t) ( $J = 6,7$ )	3,36 (t) ( $J = 6,6$ )	3,34 (t) ( $J = 6,5$ )	3,34 (t) ( $J = 6,5$ )	3,34 (t) ( $J = 6,5$ )	3,22 (s)	3,41 (c) ( $J = 7,0$ )	3,31 (t) ( $J = 6,7$ )	3,35 (t) ( $J = 6,5$ )	3,34 (t) ( $J = 6,5$ )	3,34 (t) ( $J = 6,5$ )	3,34 (t) ( $J = 6,5$ )	
2'		1,08 (t) ( $J = 6,9$ )	1,48 (m)	1,45 (m)	1,45 (m)	1,45 (m)	1,45 (m)		1,08 (t) ( $J = 6,9$ )	1,48 (m)	1,45 (m)	1,46 (m)	1,45 (m)	1,45 (m)	
3'		0,83 (t) ( $J = 7,3$ )	0,83 (t) ( $J = 7,3$ )	1,29 (m)	1,23 (m)	1,22 (m)	1,22 (m)			0,84 (t) ( $J = 7,3$ )	1,29 (m)	1,24 (m)	1,22 (m)	1,22 (m)	
4'				0,85 (t) ( $J = 7,4$ )	"	"	"				0,85 (t) ( $J = 7,3$ )	"	"	"	
5'				"	"	"	"				"	"	"	"	
6'					0,83 (t) ( $J = 7,0$ )	"	"					0,84 (t) ( $J = 7,1$ )	"	"	
7'					"	"	"					"	"	"	
8'						0,84 (t) ( $J = 7,1$ )	"						0,84 (t) ( $J = 7,0$ )	"	
9'					"	"	"						"	"	
10'					"	"	"						"	"	
11'					"	"	"						"	"	
12'							0,84 (t) ( $J = 7,0$ )							0,84 (t) ( $J = 7,0$ )	
Grupos bencilo															
CH <sub>2</sub> en 6	5,02 (s) 7,37 (m)	5,02 (s) 7,37 (m)	5,02 (s) 7,37 (m)	5,02 (s) 7,37 (m)	5,02 (s) 7,37 (m)	5,05 (s) 7,37 (m)	5,01 (s) 7,37 (m)								
Ph															
OH en pos. 6								8,63 (s)	8,62 (s)	8,66 (s)	8,62 (s)	8,61 (s)	8,65 (s)	8,62 (s)	

Tabla 11. Datos de  $^{13}\text{C}$ -RMN (125,75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 303K) para los compuestos 100-106 y 124-130. Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm)

	100	101	102	103	104	105	106	124	125	126	127	128	129	130
Unidad fenólica														
1	72,9	70,8	71,1	71,0	71,1	71,0	71,0	79,1	71,0	71,3	71,3	71,2	71,3	71,2
2	34,8	35,1	35,1	35,1	35,1	35,1	35,1	34,9	35,1	35,2	35,1	35,1	35,1	35,1
3	131,9	131,9	131,9	131,9	131,9	131,9	131,9	129,6	129,6	129,6	129,6	129,6	129,6	129,6
4	113,0	113,0	113,0	113,1	113,0	113,1	113,1	113,0	113,0	113,0	113,0	113,0	112,9	113,0
5	149,0	149,0	149,0	149,0	149,0	149,0	149,0	147,2	147,2	147,2	147,2	147,2	147,2	147,2
6	145,1	145,1	145,1	145,1	145,1	145,1	145,1	144,7	144,7	144,7	144,7	144,7	144,7	144,7
7	113,8	113,8	113,7	113,8	113,7	113,7	113,8	115,2	115,2	115,1	115,1	115,1	115,1	115,1
8	120,5	120,5	120,5	120,5	120,5	120,5	120,5	120,5	120,5	120,5	120,5	120,5	120,5	120,5
Cadena alifática														
1'	57,7	55,1	71,5	69,5	69,9	69,9	69,9	57,7	55,1	71,5	69,5	69,5	69,9	69,9
2'		15,0	22,4	31,2	29,1	29,1	29,1		15,0	22,5	31,3	29,1	29,2	29,1
3'			10,5	18,8	25,3	25,5	25,5			10,4	18,8	25,3	25,7	25,5
4'				13,5	29,1	26,7	25,9-28,6				13,7	29,1	26,7	26,9-28,6
5'					22,0	26,5	"					22,1	26,5	"
6'					13,8	31,1	"					13,8	31,2	"
7'						22,0	"						22,0	"
8'						13,8	"						13,8	"
9'							"							"
10'							31,2							31,2
11'							22,0							22,0
12'							13,8							13,8
$\text{COCH}_3$ en pos. 5	55,5	55,5	55,5	55,4	55,4	55,4	55,4	55,5	55,5	55,5	55,4	55,4	55,4	55,4
Grupos fenólicos														
6														
$\text{CH}_2$ (1'')	70,0	70,0	70,0	70,0	69,9	70,0	70,0							
2''	137,2	137,2	137,2	137,2	137,2	137,2	137,2							
3''	127,5	127,5	127,5	127,5	127,4	127,4	127,4							
4''	128,3	128,3	128,3	128,3	128,3	128,3	128,2							
6''	127,5	127,5	127,5	127,5	127,5	127,5	127,5							

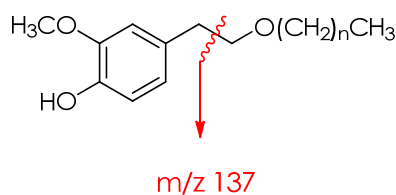
## 5.1.3.2. Espectrometría de masas (EM)

Para los derivados protegidos del alcohol homovanílico (**100-106**) tal y como ocurre en los derivados análogos ya descritos, se puede apreciar en sus espectros de masas como pico base el ión tropilio ( $m/z$  91), además del pico correspondiente a  $[M-91]^+$  y el del ión molecular, ambos de baja intensidad. Además, se observa un ión común a todos los derivados cuya relación  $m/z$  es de 137. Este ión debe aparecer por dos fragmentaciones sucesivas como se muestra en el esquema 17.



**Esquema 17.** Principales fragmentos observados en los espectros de masas de los compuestos **100-106**.

En el caso de los derivados desprotegidos del alcohol homovanílico (**124-130**), se observa el mismo tipo de iones que en los casos anteriores, es decir, el ión molecular correspondiente y un pico base que, en este caso, aparece a relación  $m/z$  137 y que corresponde al mismo tipo de fragmentación que la ya mencionada en los casos anteriores, tal y como se muestra en el esquema 18.

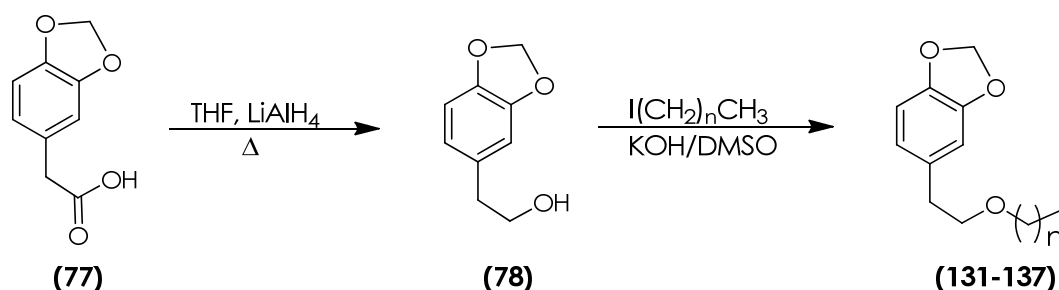


**Esquema 18.** Formación del pico base en los espectros de masas de los compuestos **124-130**.

## 5.2. Preparación y caracterización de metilendioxi derivados de hidroxitirosol

Se ha llevado a cabo la preparación de otra serie de compuestos (**131-137**) que, a pesar del hecho de presentar los *OH* fenólicos protegidos por un puente metilideno, son potencialmente interesantes debido a que, por el hecho de presentar completamente protegidos los dos *OH* fenólicos, podrían atravesar la barrera hematoencefálica y, una vez en el sistema nervioso central, liberar los correspondientes alquil éteres de hidroxitirosol libres (**103-112**) donde podrían ejercer su acción.

En el esquema 19 se muestran las condiciones para la obtención de esta serie de compuestos. Así, en una primera etapa se procede a la reducción del ácido de partida (**77**) empleando para ello hidruro de aluminio y litio. Seguidamente en una segunda etapa, se procede a la alquilación del *OH* alcohólico de la cadena lateral empleando las condiciones ya comentadas (Ver apartado 5.1.).



**Esquema 19.** Esquema general para la síntesis de los compuestos **131-137**.

Siguiendo este esquema se han obtenido siete nuevas sustancias (**131-137**) con los rendimientos químicos que se recogen en la tabla 12.

**Tabla 12.** Rendimientos químicos de los compuestos **131-137** una vez aislados y purificados.

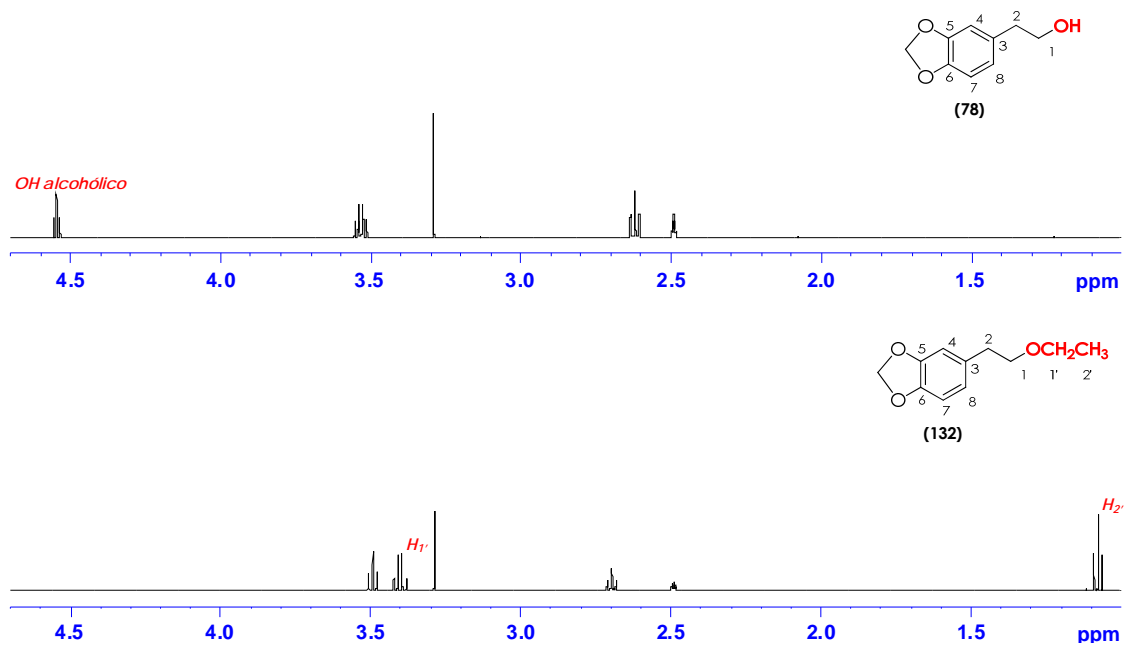
n	Compuesto	Rto (%)
0	<b>131</b>	80
1	<b>132</b>	81
2	<b>133</b>	70
3	<b>134</b>	61
5	<b>135</b>	78
7	<b>136</b>	70
11	<b>137</b>	75

Tal y como se puede observar en dicha tabla, los rendimientos varían desde aceptables (61%) hasta buenos (81%).

Todas las nuevas sustancias obtenidas han sido caracterizadas por sus espectros de IR, RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y EM, así como por sus análisis elementales. Su determinación estructural se ha realizado fundamentalmente en base a la aplicación de diversas experiencias de RMN (COSY, NOESY, HSQC, HMBC), habiéndose asignado de forma inequívoca todas las señales que aparecen en sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (tabla 13) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (tabla 14).

### 5.2.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Tal y como se ha descrito en los apartados anteriores, se toma como modelo el etil éter correspondiente. Así, la alquilación del OH alcohólico del compuesto de partida (**78**) para esta serie da lugar en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **132** a dos señales en la región alifática del espectro; un cuartete a 3,40 ppm y un triplete a 1,07 ppm. Ambas señales corresponden con la cadena de etilo introducida en la molécula (figura 14). Además, el triplete que se localiza en torno a 4,5 ppm correspondiente al OH alcohólico desaparece, como se puede observar en la misma figura.



**Figura 14.** Comparación de señales en los espectros de  $^1\text{H}$  de los compuestos **78** y **132**.

**Tabla 13.** Datos de  $^1\text{H-RMN}$  (500,13 MHz,  $\text{DMS-}d_6$ , 303K) para los compuestos 131-137. Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$ , Hz).

	131	132	133	134	135	136	137
Unidad fenililo							
1	3,45 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,49 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	3,49 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	3,48 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,48 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,48 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,48 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )
2	2,70 (t)	2,69 (t)	2,70 (t)	2,69 (t)	2,69 (t)	2,69 (t)	2,69 (t)
4	6,79 (d) ( $J_{1,2} = 1,8$ )	6,80 (d) ( $J_{1,2} = 1,4$ )	6,80 (d) ( $J_{1,2} = 1,7$ )	6,80 (d) ( $J_{1,2} = 1,6$ )	6,79 (d) ( $J_{1,2} = 1,6$ )	6,79 (d) ( $J_{1,2} = 1,6$ )	6,79 (d) ( $J_{1,2} = 1,5$ )
7	6,78 (d) ( $J_{1,2} = 7,9$ )	6,78 (d) ( $J_{1,2} = 7,8$ )	6,78 (d) ( $J_{1,2} = 7,9$ )	6,78 (d) ( $J_{1,2} = 7,9$ )	6,77 (d) ( $J_{1,2} = 7,9$ )	6,77 (d) ( $J_{1,2} = 7,9$ )	6,77 (d) ( $J_{1,2} = 7,9$ )
8	6,66 (dd)	6,66 (dd)	6,66 (dd)	6,66 (dd)	6,66 (dd)	6,66 (dd)	6,66 (dd)
Cadena alquilo							
1'	3,21 (s)	3,40 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	3,31 (t) ( $J_{1,2} = 6,0$ )	3,34 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,33 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,33 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )	3,33 (t) ( $J_{1,2} = 6,9$ )
2'		1,07 (t) ( $J_{1,2} = 7,0$ )	1,47 (m)	1,44 (m)	1,44 (m)	1,44 (m)	1,44 (m)
3'			0,82 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )	1,28 (m)	1,24 (m)	1,24 (m)	1,24 (m)
4'				0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,4$ )			
5'							
6'					0,53 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )		
7'							
8'						0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )	
9'							
10'							
11'							
12'							0,84 (t) ( $J_{1,2} = 7,1$ )
$\text{OCH}_3$	3,74 (s)	3,74 (s)	3,73 (s)	3,73 (s)	3,73 (s)	3,73 (s)	3,73 (s)

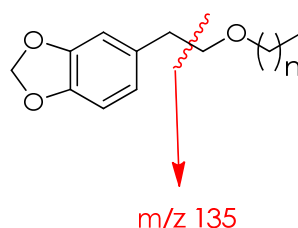
**Tabla 14.** Datos de  $^{13}\text{C}$ -RMN (125,75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 303K) para los compuestos **131-137**. Desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm).

	131	132	133	134	135	136	137
Unidad fenililo							
1	72,8	70,8	71,0	71,0	71,0	71,0	71,0
2	34,9	35,2	35,1	35,1	35,1	35,1	35,1
3	129,6	129,6	129,6	129,6	129,6	129,6	129,6
4	109,1	109,1	109,1	109,1	109,1	109,1	109,1
5	147,2	147,2	147,2	147,2	147,2	147,2	147,2
6	144,7	144,7	144,7	144,7	144,7	144,7	144,7
7	107,9	107,9	107,8	107,8	107,8	107,8	107,8
8	121,5	121,5	121,5	121,5	121,5	121,5	121,5
Cadena alquímica							
1'	57,7	65,1	71,5	69,5	69,8	69,8	69,8
2'		15,0	22,3	31,2	29,0	29,1	29,1
3'			10,5	18,7	25,2	25,6	25,6
4'				13,6	22,0	28,7	28,9-28,6
5'					31,0	28,6	"
6'					13,7	31,2	"
7'						22,0	"
8'						13,8	"
9'							"
10'							31,2
11'							22,0
12'							13,8
$\text{OCH}_2\text{O}$	100,5	100,5	100,5	100,5	100,5	100,5	100,5



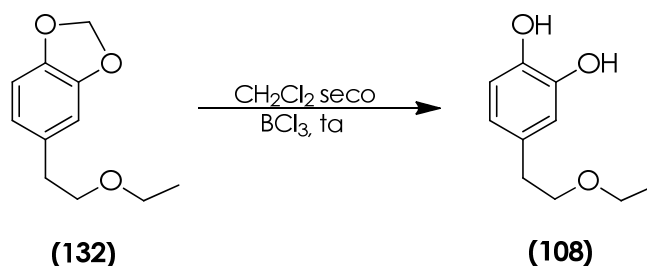
### 5.2.2. Espectrometría de masas

En cuanto a los datos obtenidos en los espectros de masas, se observa en todos los casos el ión molecular correspondiente, además de un pico base común para todos los compuestos a  $m/z$  135. Éste corresponde a la fragmentación del enlace  $\beta$  al grupo alcoxilo, tal y como se muestra en el esquema 20.



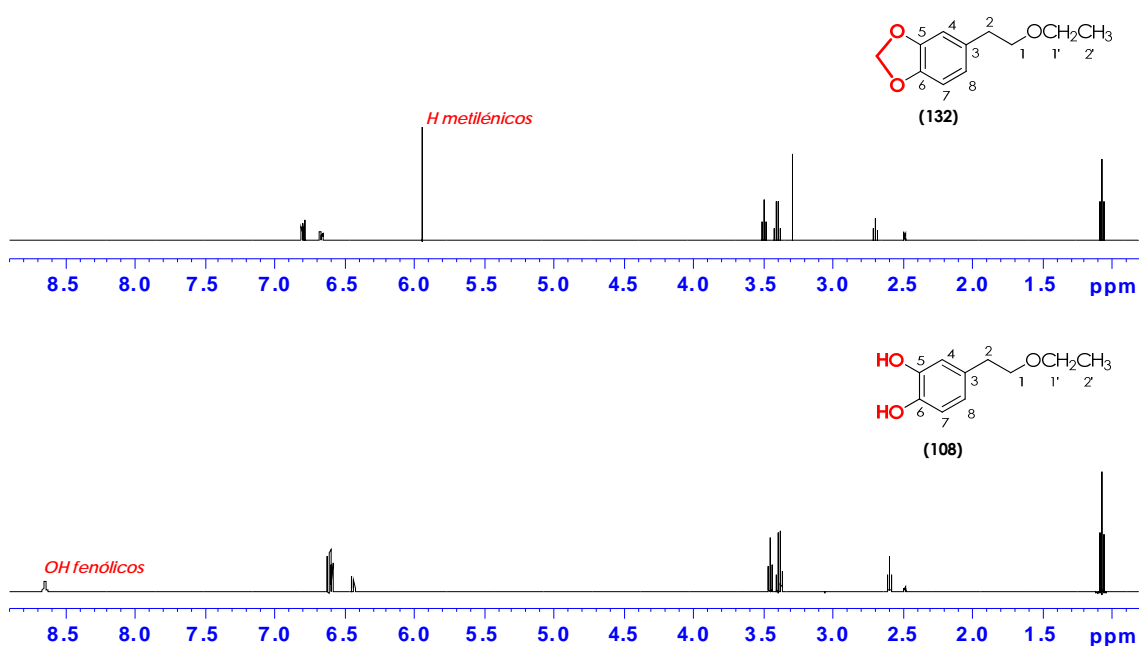
**Esquema 20.** Formación del pico base en los espectros de masas de los compuestos **131–137**.

Por otro lado, a partir de estos metilidendioxi derivados de hidroxitirosol, se ha ensayado la obtención de los alquil éteres de hidroxitirosol anteriormente descritos, mediante otro esquema de síntesis. Para ello, tal y como se muestra en el esquema 21, el compuesto **132** se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco y se hizo reaccionar con  $\text{BCl}_3$ . La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se confirma por cromatografía en capa fina el fin de la reacción (4 horas). A continuación se procesó lavando con  $\text{NaHCO}_3$  saturado y extrayendo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Seguidamente se añadió  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se evaporó el disolvente.



**Esquema 21.** Ruta alternativa para la síntesis de éteres derivados de HTy.

En la figura 15 se comparan los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **132** con el correspondiente producto de la reacción, que resulta ser el etil hidroxitirosol libre. Se puede observar que el singulete correspondiente a los protones del puente metilénico localizado a 5,94 ppm, desaparece en el espectro obtenido al finalizar la reacción. Además, en éste aparece un singulete a 8,5 ppm aproximadamente, que corresponde a los *OH* fenólicos del derivado libre. Sin embargo, no fue posible el aislamiento ya que en el proceso de purificación se pierde el producto.

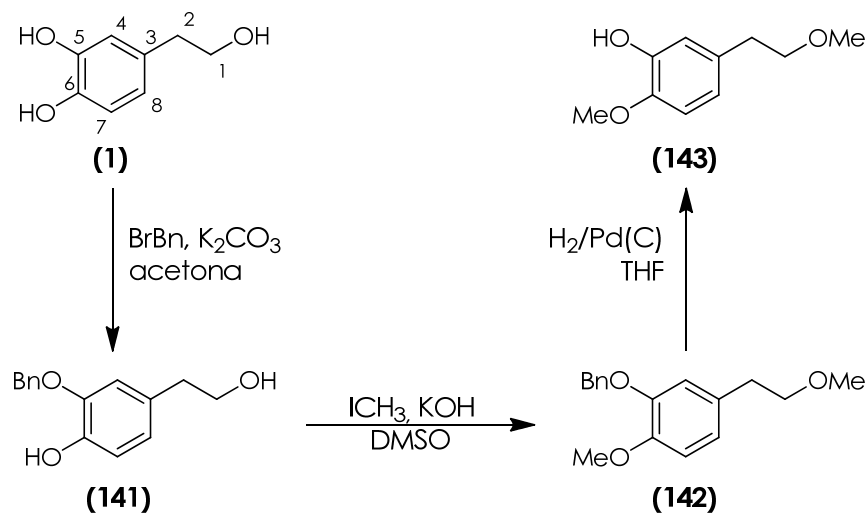


**Figura 15.** Comparación de señales en los espectros de  $^1\text{H}$  de los compuestos **132** y **108**.

### 5.3. Síntesis de 2-metoxi-5-(2'-metoxietil)fenol (**143**)

El trabajo presentado en esta memoria forma parte de un proyecto más amplio, en el que se estudia por otra parte el metabolismo de los éteres obtenidos, tanto a nivel intestinal como hepático. Entre los metabolitos esperados para los éteres de hidroxitirosol se encuentran sus metil derivados, ya sea en posición 5 o 6 del anillo catecólico. Por ello, se hacía necesario disponer de ambos regioisómeros con objeto de suministrárselos posteriormente al grupo que debía realizar el estudio metabólico.

Por ello, se ha llevado a cabo la síntesis del compuesto **143** a partir de hidroxitirosol libre en un proceso que ha constado de tres etapas, tal y como se muestra en el esquema 22.



**Esquema 22.** Obtención del compuesto **143**

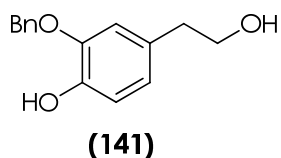
### 5.3.1. Primera etapa: Protección regioselectiva

En una primera etapa, se hizo reaccionar hidroxitirosol con bromuro de bencilo en presencia de carbonato potásico, al igual que para la protección de sus dos *OH* fenólicos (ver apartado 5.1.), pero empleando cantidades de reactivos inferiores además de disminuir el tiempo de reacción. En particular, se empleó la mitad de bromuro de bencilo y la cuarta parte de carbonato potásico con idea de conseguir una cierta regioselectividad en la protección de los *OH* fenólicos.

Así, tras 45 minutos de reacción, ésta se detiene y por ccf se observa que se han formado, como era de esperar, varios productos. Tras una separación cromatográfica en columna en la que se emplearon diversos eluyentes de distinta polaridad para aislar todos los compuestos formados, se separaron cuatro fracciones en las que se identificaron un total de seis compuestos. Todas sus estructuras fueron determinadas mediante el empleo

de diferentes experimentos de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , NOESY, HSQC, HMBC) asignándose de forma inequívoca todas las señales en todos los casos.

El compuesto buscado (**141**) se aisló con un 25% de rendimiento en la cuarta y última fracción.



Tal y como se puede observar en la figura 16, en el espectro de protones del compuesto **141** aparecen las señales correspondientes al conjunto de protones aromáticos correspondiente a un único grupo bencilo introducido a unos 7,4 ppm, así como el singulete correspondiente al metileno de la posición bencílica, que aparece a 5,05 ppm.

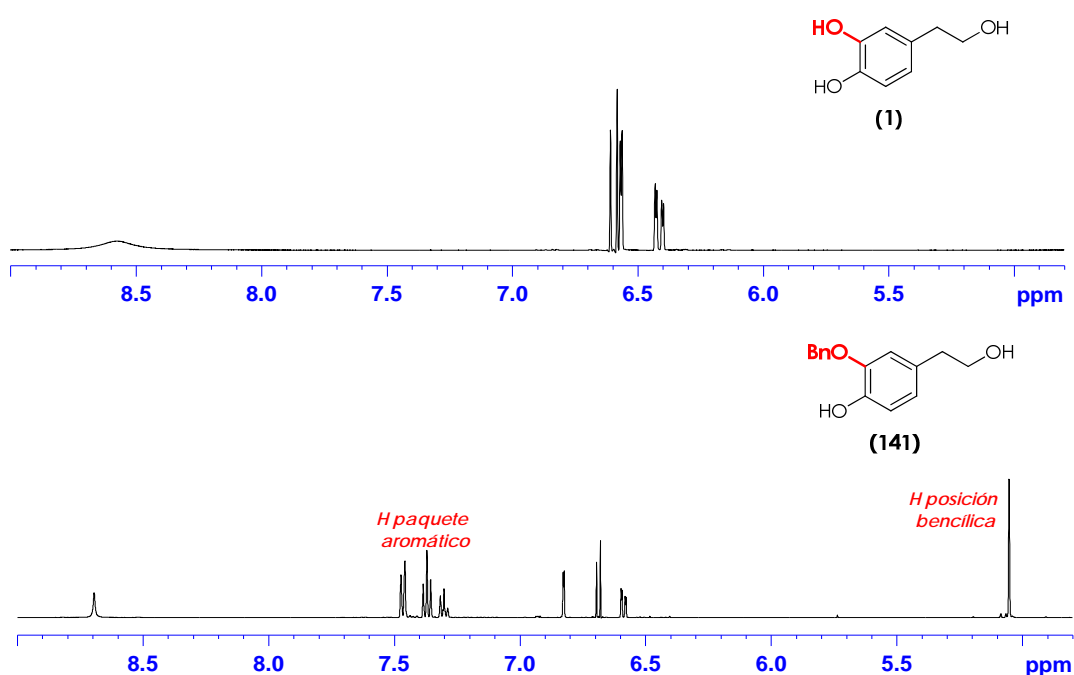
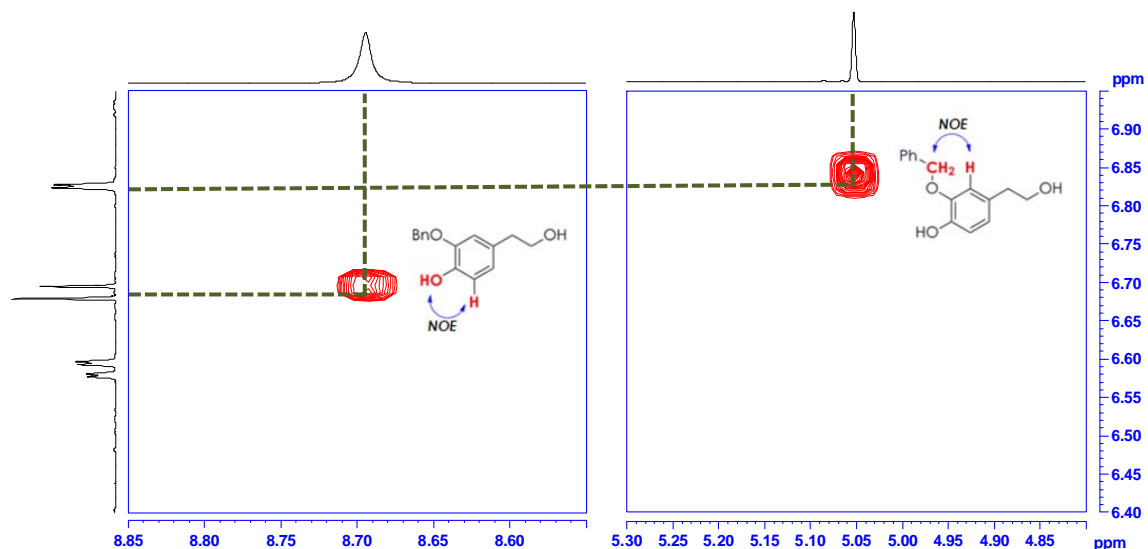


Figura 16. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos **1** y **141**.

La posición en la que se encuentra este grupo bencilo se determinó mediante un experimento NOESY. Como se muestra en la figura 17, existe un efecto NOE entre los protones del grupo metileno de la posición bencílica, que

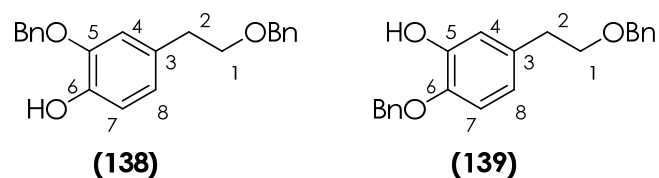
aparecen como un singulete a un desplazamiento químico de 5,05 ppm, y el protón  $H_4$  del anillo aromático, que aparece como un doblete a 6,82 ppm.

Por otro lado, en el mismo experimento NOESY se observa efecto NOE entre el OH fenólico, que aparece como un singulete a 8,69 ppm, y el protón  $H_7$  del anillo aromático, que aparece como un doblete a 6,68 ppm. Todo ello, permite concluir que el grupo bencilo está presente en la posición 5 del anillo del compuesto **141**.



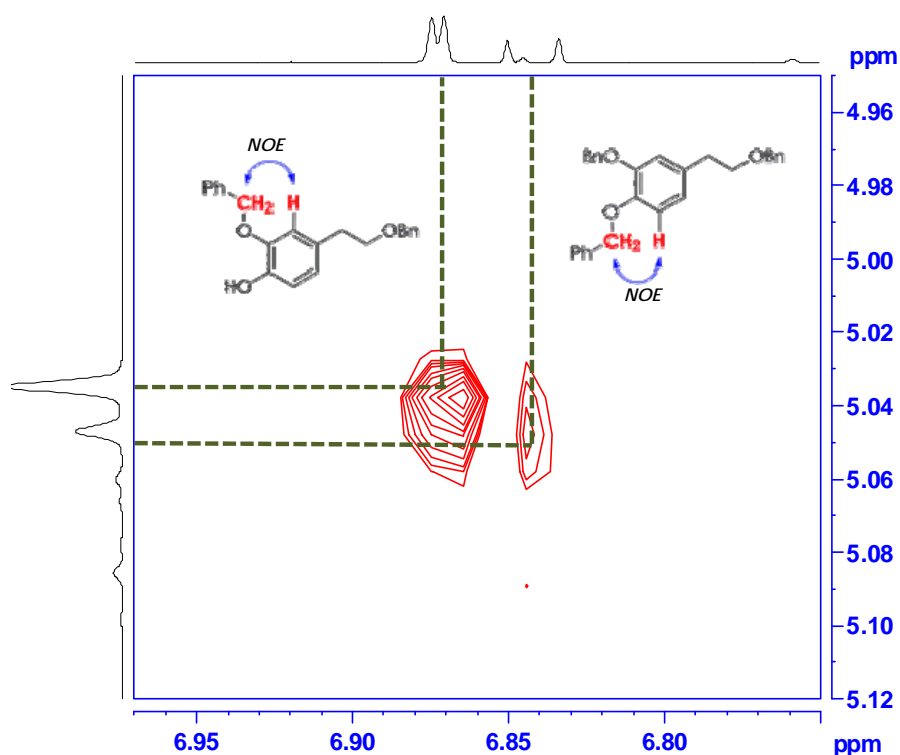
**Figura 17.** Espectros de NOESY del compuesto **141** para localizar al grupo bencilo y al OH fenólico.

Por otra parte, y como se ha mencionado anteriormente, en esta misma reacción se aislaron otros compuestos en diversas fracciones y que se detallan a continuación. Así, en la primera de ellas se identificaron los compuestos **138** y **139** siendo el primero de ellos el presente en mayor cantidad, 2,4% frente al 1% del segundo.



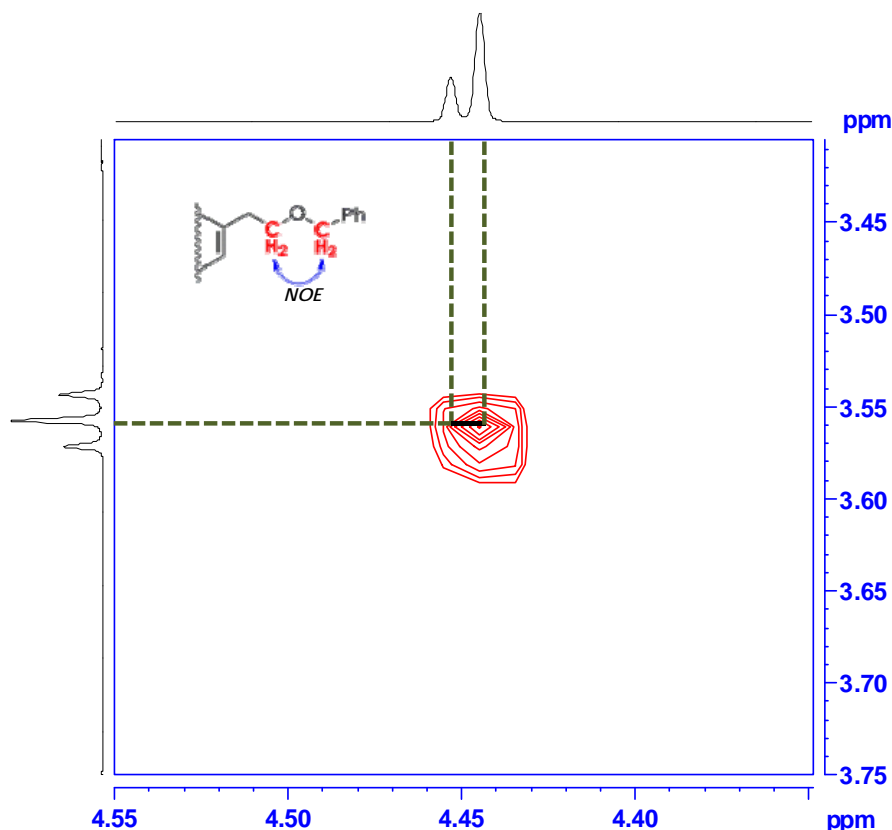
Los experimentos de RMN realizados confirmaron la estructura propuesta para ambos, de manera que la posición del grupo bencilo en el anillo aromático se determinó mediante experimentos bidimensionales NOESY. Así,

para el compuesto mayoritario **138**, tal y como se muestra en la figura 18, se observa un efecto *NOE* entre los protones del grupo metileno de la posición bencílica, que aparecen como un singulete a 5,03 ppm, y el protón  $H_4$  del anillo, que aparece como un doblete a 6,87 ppm. Para el compuesto minoritario **139**, se observa igualmente un efecto *NOE* entre los protones del grupo metileno de la posición bencílica, que aparecen como un singulete en este caso a un desplazamiento químico de 5,04 ppm y el protón  $H_7$  del anillo, que aparece como un doblete a 6,84 ppm.



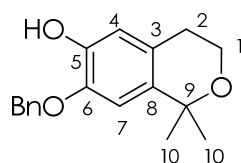
**Figura 18.** Efecto *NOE* en los compuestos **138** y **139** para asignar la posición de los grupos bencilo en el anillo aromático.

Asimismo se ha determinado, también mediante experimentos *NOESY* (figura 19), que el segundo grupo bencilo que contienen ambos compuestos se ha introducido en la cadena lateral sustituyendo al *OH* alcohólico del hidroxitirosol. En ambos casos se observa un efecto *NOE* entre los protones del grupo metileno de la posición bencílica, que aparecen como un singulete a 4,44 ppm para el compuesto **138** y a 4,45 ppm para el **139**, y los protones del grupo metileno en posición 1 de la cadena alquílica lateral, que aparecen como un triplete a 3,55 ppm en ambos compuestos.



**Figura 19.** Efecto NOE en los compuestos **138** y **139** para asignar la posición del grupo bencilo en la cadena lateral.

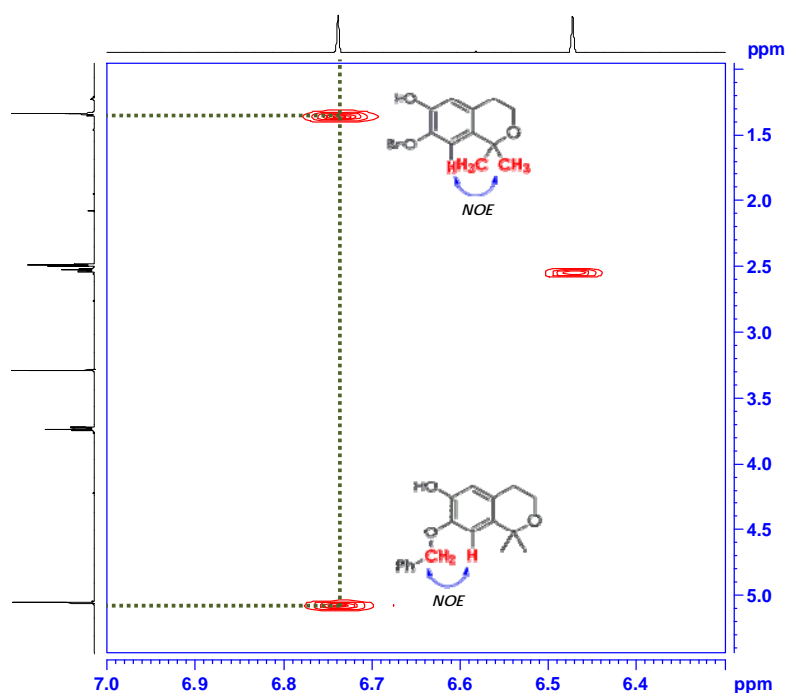
En la segunda fracción se identificó el compuesto **140**, con un 17% de rendimiento, encontrándose que es un derivado con estructura de isocromano con el *OH* fenólico en posición 6 bencilado.



**(140)**

Para la determinación de su estructura se asignaron de forma inequívoca todas las señales que aparecen en sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN mediante diversos experimentos. Así, con el espectro 2D-NOESY permitió comprobar que el único grupo bencilo presente se localiza en la posición 6 ya

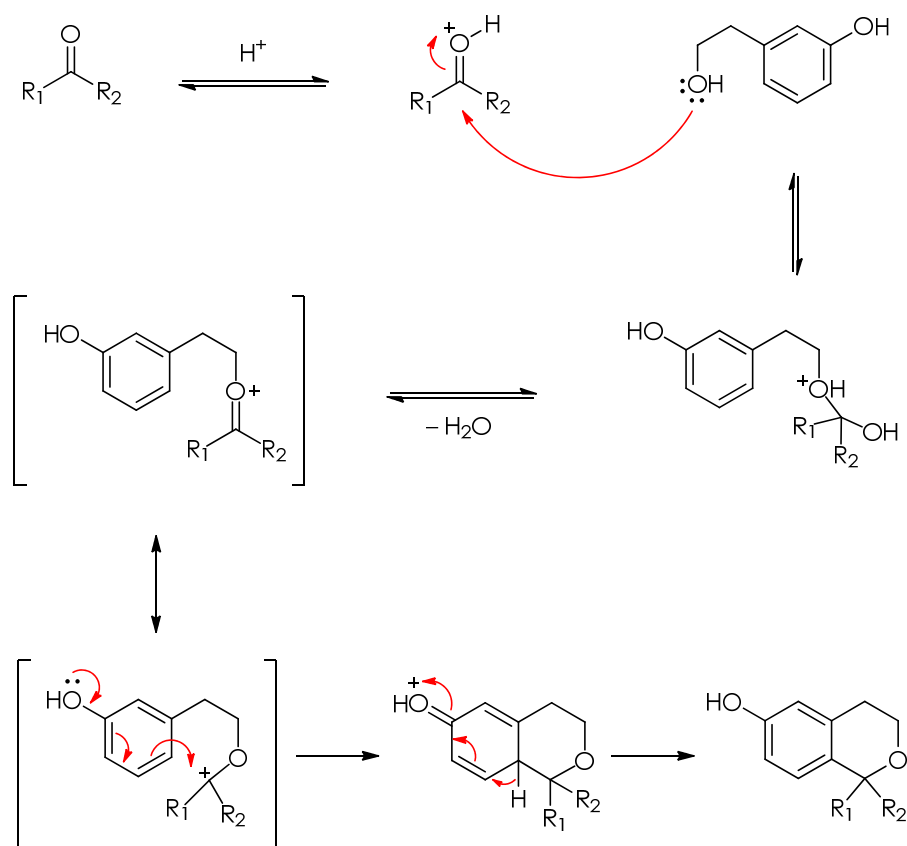
que, como se puede ver en la figura 20, hay un efecto NOE entre los protones del grupo metileno de la posición bencílica que aparecen a 5,05 ppm y el protón  $H_7$  del anillo aromático que aparece como un singulete a 6,73 ppm. Además, en la misma figura se muestra el efecto NOE que se produce entre los protones  $H_{10}$  de los dos grupos metilo, que aparecen igualmente como un singulete a 1,33 ppm, y el mismo protón  $H_7$  del anillo aromático. La estructura propuesta para este compuesto se confirma finalmente mediante experimentos HSQC y HMBC que no se muestran.



**Figura 20.** Efecto NOE en el compuesto **140** para asignar la posición de los grupos bencilo y metilo.

La formación de este compuesto tiene su explicación en la reacción de "oxa-Pictet-Spengler"<sup>145</sup> cuyo mecanismo se detalla el esquema 23.





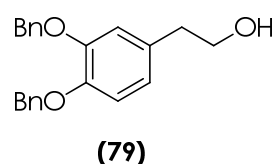
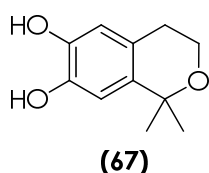
**Esquema 23.** Mecanismo de la reacción de oxa-Pictet-Spengler.

En primer lugar el derivado ariletanólico reacciona con el compuesto carbonílico en medio ácido, dando lugar a la formación de un hemiacetal que, posteriormente, pierde una molécula de agua originando la estructura isocrománica por cierre de un anillo de seis miembros, con el carbono aromático activado por el grupo OH presente en posición *para*.

En nuestro caso se puede explicar la formación de este compuesto debido a que las condiciones de basicidad empleadas fueron muy suaves ya que, en esta etapa, el objetivo era la monobencilación del hidroxitirosol. Por ello, al agotarse la base y, por hidrólisis del bromuro de bencilo que pudiera quedar en exceso, se puede generar la acidez necesaria para que se forme el compuesto **140**. Además, es determinante para la formación de este derivado, la presencia del OH fenólico en posición 5 del anillo aromático que es el responsable de la activación del carbono en posición *para* respecto de dicho OH.

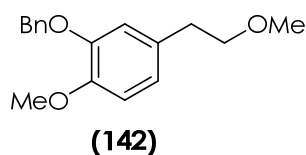
Por otro lado, la formación de este compuesto podría explicar el hecho que no se haya aislado el correspondiente regioisómero de **141**, ya que a partir de él se habría formado el isocromano aislado.

Por último, en la tercera de las fracciones se aislaron dos compuestos, **67** y **79**, que ya han sido mencionados previamente en la presente Memoria, cuyos datos de RMN estaban de acuerdo con los previamente descritos en la bibliografía<sup>156, 195</sup>.



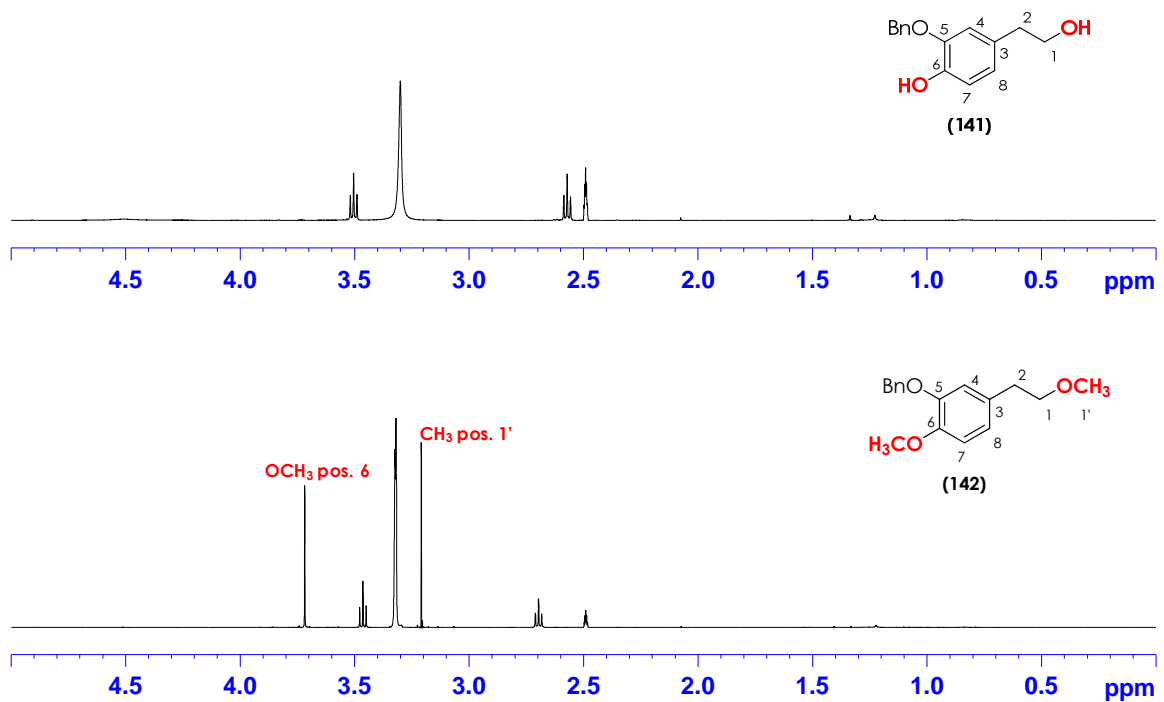
### 5.3.2. Segunda etapa: Reacción de alquilación

En la segunda etapa del ensayo, se procedió a la alquilación de los dos grupos *OH* (fenólico y alcohólico) libres. Para ello se empleó el mismo procedimiento de alquilación que el ya descrito (ver apartado 4.3.1.) pero con modificaciones. Así, se utilizó doble cantidad de agente alquilante ( $\text{CH}_3\text{I}$ ) que el empleado en el procedimiento general. En esta etapa se obtuvo el compuesto esperado (**142**) con un rendimiento prácticamente cuantitativo.



Se asignaron de forma inequívoca todas las señales que aparecen en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN de este compuesto. En la figura 21, en la que se presenta el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de este compuesto comparado con el de su precursor, el compuesto **141**. En el espectro del compuesto **142** se pueden observar las señales características de los grupos  $\text{OCH}_3$  presentes en su estructura y que no aparecen en el correspondiente espectro del compuesto

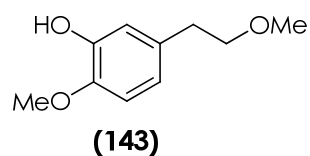
**141**. Así, a 3,70 ppm se localiza un singulete que corresponde con el grupo  $\text{OCH}_3$  situado en posición 6 en el compuesto **142**. Por otro lado, a 3,21 ppm se localiza otro singulete que en este caso corresponde con el grupo metilo de la cadena alquílica lateral.



**Figura 21.** Comparación de señales en los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  de los compuestos **141** y **142**.

### 5.3.3. Tercera etapa: Eliminación del grupo protector

En la tercera y última etapa, se procedió a la desprotección del OH fenólico de la posición 5 empleando para ello el procedimiento de hidrogenolisis general (ver apartado 4.3.2.). Se obtuvo el compuesto esperado (**143**) con un rendimiento del 87%.



Comparando los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (figura 22) de este compuesto con el de su precursor (**142**) se puede observar la desaparición de las señales correspondientes al grupo bencilo, que se localizan a 7,37 y 5,03 ppm en el espectro del compuesto **142**, y la aparición de un singulete a 8,74 ppm que corresponde al *OH* fenólico liberado en posición 5 en el compuesto **143**.

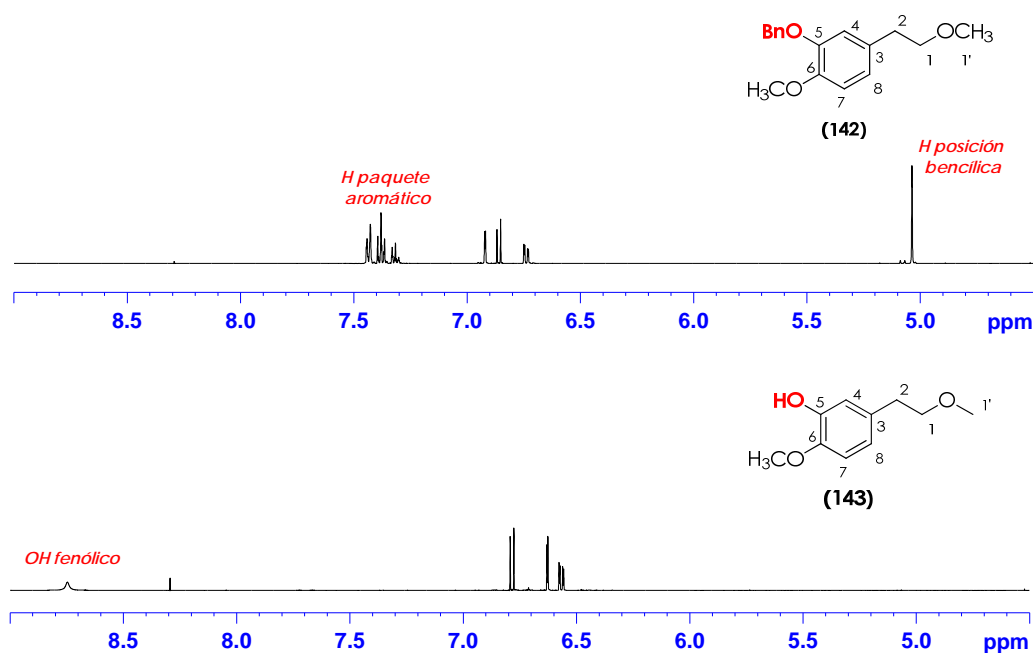
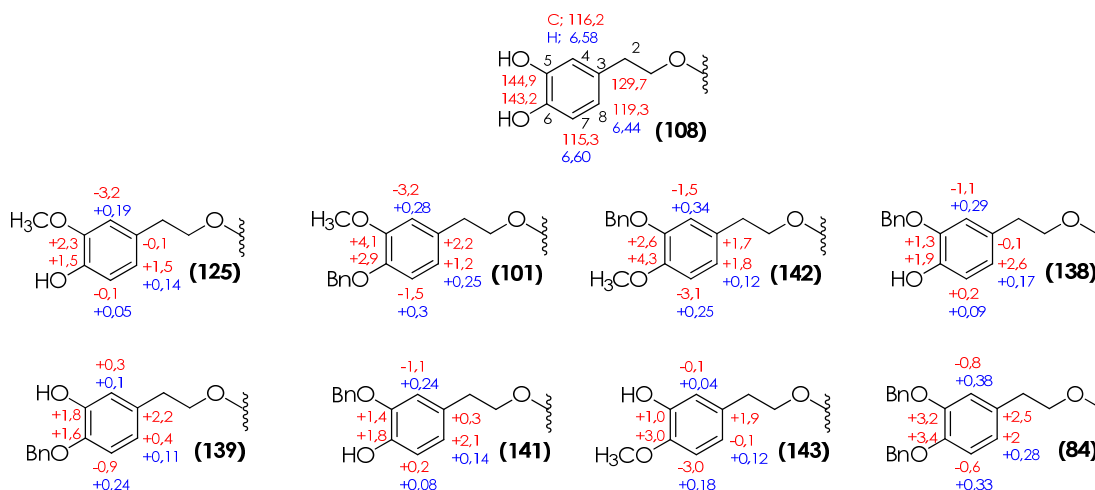


Figura 22. Comparación de señales en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos **142** y **143**.

Por otro lado y, una vez asignadas de forma inequívoca todas las señales correspondientes a los compuestos detallados en los apartados precedentes, se puede establecer que la sustitución de uno o los dos grupos *OH* del anillo aromático dan lugar a una variación del desplazamiento químico apreciable tanto en el espectro de  $^1\text{H}$  como de  $^{13}\text{C}$ , tal y como se puede apreciar en la figura 23.



**Figura 23.** Efecto aditivo de los sustituyentes sobre el  $\delta$  de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en el anillo aromático.

En dicha figura se puede observar que la O-metilación en posición 5 (compuesto **125**) origina un apantallamiento de -3,2 ppm en el carbono *orto* ( $\text{C}_4$ ) y desapantallamientos de +1,5 ppm sobre el carbono no sustituido ( $\text{C}_6$ ) y sobre el carbono en posición *para* ( $\text{C}_3$ ). Se observan efectos cambiados sobre el desplazamiento en el caso del compuesto **143**, que presenta el grupo O-metilo en posición 6.

Cuando, como ocurre en el compuesto **101**, se produce la sustitución de ambos hidroxilos fenólicos por un grupo O-metilo en posición 5 y un grupo O-bencilo en posición 6, se observa, además de los desplazamientos producidos por el grupo O-metilo ya vistos, un apantallamiento del carbono en *orto* respecto del carbono O-bencilado de -1,5 ppm. En el caso en que los sustituyentes están cambiados, es decir, el grupo O-metilo en posición 6 y el grupo O-bencilo en posición 5 (compuesto **142**), se observan los mismos efectos sobre el desplazamiento pero cambiados. En cuanto a los carbonos sustituidos ( $\text{C}_5$  y  $\text{C}_6$ ), se observan efectos aditivos sobre el desplazamiento químico.

En cuanto a la O-bencilación sobre cualquiera de los dos hidroxilos fenólicos (compuestos **138**, **139** y **141**), se observan efectos similares, produciéndose apantallamientos promedios de -1 ppm sobre el carbono en

posición *orto* al sustituido y apantallamientos promedios de +2,3 ppm sobre el carbono en *para* al sustituido.

Cuando se da la *O*-bencilación sobre los dos *OH* fenólicos (compuesto **84**), se observan efectos prácticamente aditivos sobre el desplazamiento químico.

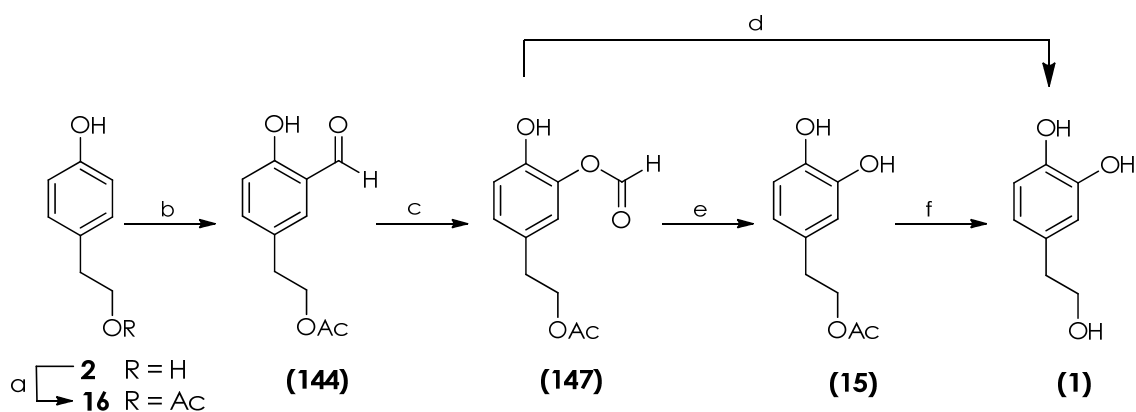
Por último, las variaciones en el desplazamiento químico de los protones van a ser más importantes sobre los protones de las posiciones *orto* respecto de los carbonos sustituidos y, en menor medida, sobre los protones de las posiciones *para* al carbono sustituido.

#### **5.4. Síntesis de hidroxitirosol y sus nuevas formas protegidas**

Se ha llevado a cabo la síntesis de hidroxitirosol empleando para ello tirosol comercial como producto de partida. Además, se ha preparado una serie de derivados de hidroxitirosol ortogonalmente protegidos.

##### ***5.4.1. Synthesis of hydroxytyrosol (1)***

Hydroxytyrosol has been obtained from tyrosol through a five steps procedure, where the key step was a Baeyer-Villiger oxidation process that allows to obtain the second phenolic *OH* so that the *o*-catechol moiety of hydroxytyrosol can be formed (scheme 24).



Conditions: a) AcOEt, TsOH, 70°C; b) MgCl<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, 80°C; c) *m*-CPBA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 24h, 40°C; d) NH<sub>3</sub> 4M in MeOH, 48h, rt; e) NH<sub>3</sub> 2M in MeOH, 1h, rt; f) HCl 2M, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt

**Scheme 24.** General scheme to obtain hydroxytyrosol.

To this end, commercial tyrosol has been used as starting, affordable, material. The first step was the protection of the alcoholic OH by reaction with ethyl acetate in the presence of *p*-toluensulphonic acid as a catalyst<sup>32</sup>. Tyrosyl acetate (**16**) was so obtained, which in the second stage undergoes formylation reaction by treatment with MgCl<sub>2</sub>/(CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> in presence of triethylamine yielding the corresponding *ortho*-formyl derivative (**144**).

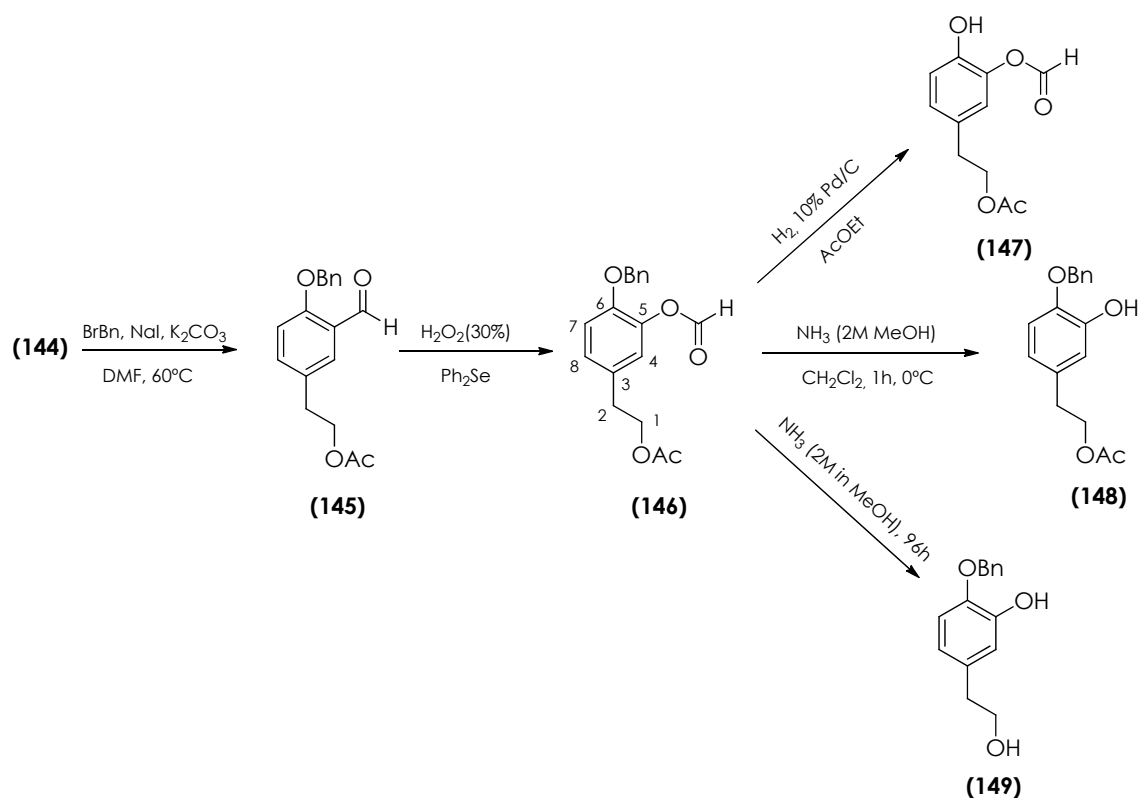
In the third stage of the process, compound **144** was subjected to a Baeyer-Villiger oxidation to introduce the second phenolic OH that generates the *o*-catechol moiety. In this way, the use of *m*-chloroperbenzoic acid in dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) under optimized conditions of time and temperature (40 °C, 24 h of stirring) yielded the best conversion results. After that, hydrolysis of the formate group in **147** with a 2M NH<sub>3</sub> methanolic solution, yielded hydroxytyrosyl acetate (**15**).

In the final step, the hydrolysis of the acetate group took place by reaction with 2M HCl. The mixture was stirred for 48 hours at room temperature to provide free hydroxytyrosol (**1**) with excellent yield (97%).

Alternatively, hydrolysis of the *formate* (**147**) with a 4M NH<sub>3</sub> methanolic solution for 48 hours at room temperature, directly yielded hydroxytyrosol (**1**) with a good chemical yield (87%), simplifying the overall process to four steps.

### 5.4.2. Synthesis of protected forms of hydroxytyrosol

In scheme 25 the synthesis of orthogonally protected forms of hydroxytyrosol is shown.



**Scheme 25.** General scheme to obtain new protected forms of hydroxytyrosol.

In a first step, compound **144** was benzylated using standard benzylation conditions ( $\text{BnBr}/\text{NaI}/\text{K}_2\text{CO}_3$ ), yielding compound **145** in 90%. This compound was then subjected to a Baeyer-Villiger oxidation. In this case, the reaction conditions used before with **144** did not yield the desired compound. The best result was obtained under those conditions employed by Syper *et al.*<sup>201</sup>. Thus, a catalytic amount of diphenylselenide ( $\text{Ph}_2\text{Se}$ ) as an activator of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) was used to obtain fully protected hydroxytyrosol (**146**) in 84%.

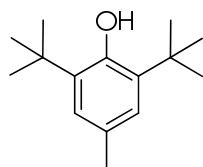


From this compound were obtained three new protected forms of hydroxytyrosol (**147-149**) by a selective deprotection of the phenolic *OH* of compound **146**. So to obtain these selectively protected forms of hydroxytyrosol different reaction conditions were used. On the one hand, the hydrogenolysis of compound **146** gave compound **147** in 98% yield, which presents a free *OH* in position 6.

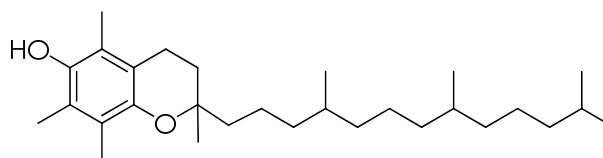
On the other hand, treatment of **146** with 5 equivalents of a 2M  $\text{NH}_3$  methanolic solution in dichloromethane for 1 h gave compound **148**, with a free *OH* in position 5, in 89%. Finally, the same treatment, in this case for 96 hours, yielded compound **149** having both, *OH* in position 5 and alcoholic *OH* deprotected.

### 5.5. Estimación de la lipofilia de los éteres alquílicos derivados de hidroxitirosol

Se ha estimado la lipofilia de todos los éteres desprotegidos sintetizados (**107-130**) utilizando para ello dos aproximaciones diferentes descritas en la bibliografía: el factor de apolaridad y el coeficiente de reparto. Asimismo, se han incluido en este estudio los patrones que posteriormente serán utilizados en la evaluación de la actividad antioxidante: hidroxitirosol (**1**), tirosol (**2**) y alcohol homovanílico (**3**) libres, así como butilhidroxitolueno (BHT, **150**) y  $\alpha$ -tocoferol (**151**).



(150)



(151)

### 5.5.1. Estimación del Factor de Apolaridad (F.A.)

El factor de apolaridad (FA) se define como el factor de retención ( $R_f$ ) mostrado en ccf por las sustancias analizadas.<sup>106</sup> Para ello se ha utilizado como eluyente una mezcla de *t*-butilmetil éter/hexano 2:1, obteniéndose los valores reflejados en la tabla 14. En ésta se puede apreciar cómo la lipofilia de los compuestos aumenta a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica lateral introducida. Así podemos ordenar los compuestos en orden creciente de FA y por serie, tal y como se detalla a continuación. Para la serie del hidroxitirosol: **1 < 107 < 108 < 109 < 110 < 111 < 112 = 113 < 114 < 115 < 116 < 149 < 148**. Para la serie del tirosol: **2 < 117 < 118 < 119 < 120 < 121 = 122 < 123 < 149 < 148**. Por último, para la serie del alcohol homovanílico: **3 < 124 < 125 < 126 < 127 < 128 < 129 < 130 < 149 < 148**.

### 5.5.2. Cálculo del logaritmo del coeficiente de reparto (CLogP)

El coeficiente de reparto ha sido calculado mediante la aplicación del programa ChemDraw, incluido en el software ChemOffice versión 12.0 de CambridgeSoft Co., que se expresa en forma de su logaritmo decimal (CLogP), para cada uno de los compuestos. Los valores estimados por dicho programa se presentan asimismo en la tabla 15.

**Tabla 15.** Estimación de la lipofilia de las sustancias analizadas. Valores de FA y CLogP.

Compuesto	FA	ClogP	Compuesto	FA	CLogP
<b>1</b>	0,19	0,96	<b>119</b>	0,73	2,54
<b>107</b>	0,34	1,32	<b>120</b>	0,75	2,95
<b>108</b>	0,46	1,66	<b>121</b>	0,78	3,79
<b>109</b>	0,51	2,15	<b>122</b>	0,78	4,62
<b>110</b>	0,62	2,56	<b>123</b>	0,80	6,29
<b>111</b>	0,64	3,40	<b>3</b>	0,24	1,22
<b>112</b>	0,66	4,23	<b>124</b>	0,60	1,58
<b>113</b>	0,66	5,07	<b>125</b>	0,66	1,92
<b>114</b>	0,69	5,90	<b>126</b>	0,71	2,41
<b>115</b>	0,71	7,57	<b>127</b>	0,75	2,83
<b>116</b>	0,73	8,41	<b>128</b>	0,78	3,66
<b>2</b>	0,31	1,35	<b>129</b>	0,80	4,50
<b>117</b>	0,66	1,71	<b>130</b>	0,82	6,16
<b>118</b>	0,69	2,05	<b>150</b>	0,97	5,54
			<b>151</b>	0,93	9,98

Al igual que se ha indicado en el caso del factor de apolaridad, se pueden ordenar los distintos compuestos sintetizados en orden creciente de Clog P y por serie. Así, para la serie de derivados del hidroxitirosol: **1 < 107 < 108 < 109 < 110 < 111 < 112 < 113 < 150 < 114 < 115 < 116 < 151**. Para la serie de derivados del tirosol: **2 < 117 < 118 < 119 < 120 < 121 < 122 < 150 < 123 < 151**. Por último, para la serie de derivados del alcohol homovanílico: **3 < 124 < 125 < 126 < 127 < 128 < 129 < 150 < 130 < 151**.

Cabe destacar cómo el resultado obtenido por la aplicación de ambos métodos es muy parecido, siendo los fenoles libres de partida las sustancias más polares en cada serie analizada. Los diversos éteres sintetizados (**107–130**) han mostrado, como era de prever, un aumento de la lipofilia a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica.

## 5.6. Evaluación de la actividad antioxidante por métodos químicos

Se ha evaluado la actividad antioxidante de los compuestos sintetizados, comparando su comportamiento con las sustancias patrones antes mencionadas: hidroxitirosol (**1**), tirosol (**2**), alcohol homovanílico (**3**), butilhidroxitolueno (BHT, **150**) y  $\alpha$ -tocoferol (**151**). Para ello, y dada la conveniencia de utilizar más de un método de estudio, como ha quedado recogido en el apartado 2.6 de esta memoria, se ha evaluado la actividad antioxidante mediante cuatro métodos diferentes. Los resultados obtenidos en cada caso se recogen a continuación.

### 5.6.1. Estabilidad oxidativa en aceite vegetal (método Rancimat<sup>®</sup>)

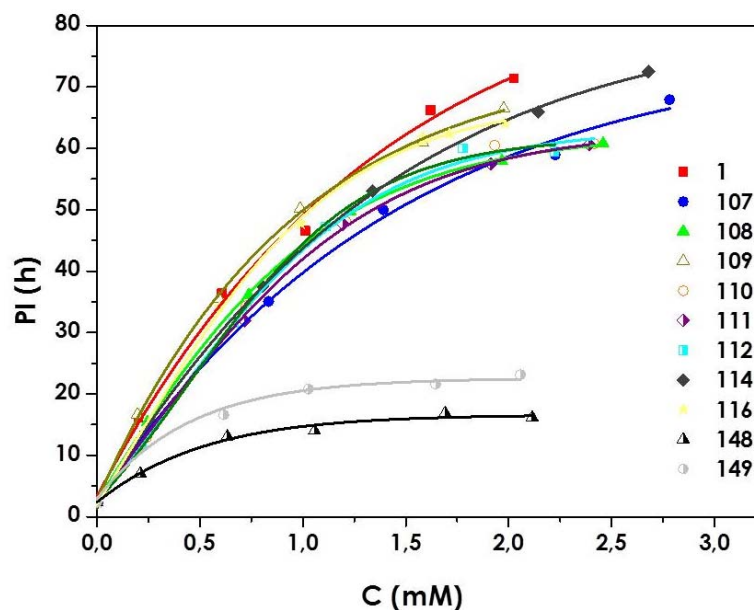
Para llevar a cabo este estudio de estabilidad se ha utilizada una matriz triglicéridica procedente de un aceite de girasol comercial para el ensayo correspondiente a los derivados de hidroxitirosol, y aceite de oliva virgen de la variedad *Arbequina* para el ensayo de los derivados de tirosol y alcohol homovanílico. Con el aceite de girasol se observaron diferencias entre la serie del hidroxitirosol (HTy) y la del tirosol (Ty) y alcohol homovanílico (HMY), siendo la del HTy la más activa. Sin embargo, en el caso de los derivados de Ty y HMY, no se observaron diferencias entre los compuestos de una misma serie debido a la rápida oxidación que se produce en este tipo de aceite, por la presencia de un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (fundamentalmente ácido linoleico). Además, a 90°C las estabildades de los aceites eran muy similares y no se distinguía entre el metil derivado y el dodecil derivado en ambas series. Por este motivo se eligió una matriz menos insaturada como es el aceite de oliva virgen y al mismo tiempo se disminuyó la temperatura a la que se realiza el ensayo a 80°C para aumentar el periodo de inducción de la matriz base y, de esta manera, poder observar diferencias entre los compuestos de una misma serie.

En cualquier caso, el aceite se ha purificado (*apartado 4.5.2.*) con objeto de eliminar posibles interferencias de los estabilizantes que pudiera contener. Una vez purificado, se ha determinado su composición en ácidos grasos siguiendo el método analítico oficial de análisis del Consejo Oleícola Internacional (COI), mediante cromatografía de gases de sus ésteres metílicos<sup>202</sup>. El resultado de dicho análisis para el aceite de girasol comercial ha sido el siguiente: Ácido Palmítico (C<sub>16:0</sub>), 6,1%; ácido palmitoleico (C<sub>16:1</sub>), 0,1%; ácido esteárico (C<sub>18:0</sub>), 3,6%; ácido oleico (C<sub>18:1</sub>), 29,3%; ácido linoleico (C<sub>18:2</sub>), 59,7%; ácido linolénico (C<sub>18:3</sub>) 0,1%; ácido behénico (C<sub>22:0</sub>) 0,6%. La composición en ácidos grasos del AOV fue: Ácido Palmítico (C<sub>16:0</sub>), 15,0%; ácido palmitoleico (C<sub>16:1</sub>), 1,4%; ácido margárico (C<sub>17:0</sub>), 0,1%; ácido heptadecenoico (C<sub>17:1</sub>), 0,2%; ácido esteárico (C<sub>18:0</sub>), 1,8%; ácido oleico (C<sub>18:1</sub>), 70,2%; ácido linoleico (C<sub>18:2</sub>), 10,0%; ácido linolénico (C<sub>18:3</sub>), 0,5%; ácido gadoleico(C<sub>20:1</sub>), 0,3%; ácido behénico (C<sub>22:0</sub>) 0,1%

La medida de la estabilidad oxidativa de la matriz lipídica así preparada se ha llevado a cabo mediante el procedimiento acelerado Rancimat® (*apartado 4.5.5.*), con variaciones como se verá a continuación, donde la oxidación tiene lugar con saturación de aire. Durante la oxidación se producen compuestos volátiles; el tiempo en horas que tardan éstos en producirse como consecuencia del inicio de la oxidación secundaria de las grasas se denomina *período de inducción* (P.I.) y es lo que se mide con este método.

#### 5.6.1.1. Método Rancimat®. Derivados de hidroxitirosol

El ensayo para estos derivados se ha llevado a cabo empleando como matriz triglicéridica un aceite de girasol comercial, previamente purificado. En dicha matriz se han sembrado cantidades crecientes de los compuestos en estudio con concentraciones que varían entre 0,2 y 3 mM para someterla, a continuación, a un proceso de oxidación acelerada a 90°C. Los resultados se muestran en la figura 24.



**Figura 24.** Estabilidad Rancimat (P.I.) de matrices glicéridicas sembradas con cantidades crecientes de hidroxitirosol (**1**) y sus éteres derivados **107-112**, **114**, **116**.

Cuando la matriz no contiene antioxidantes su estabilidad es de 2 horas. A medida que se añaden cantidades crecientes de las sustancias investigadas, el periodo de inducción va aumentando, aunque no en la misma medida en todos los casos. Ello indica que todos los compuestos ensayados poseen actividad antioxidante.

Además, como se puede observar en la figura, todos los éteres de hidroxitirosilo analizados (**107-112**, **114**, **116**) proporcionan una mayor estabilidad oxidativa a la matriz lipídica que los antioxidantes comúnmente utilizados como son el BHT (**150**) y el  $\alpha$ -tocoferol (**151**), a cualquiera de las concentraciones a las que se ha llevado a cabo el estudio.

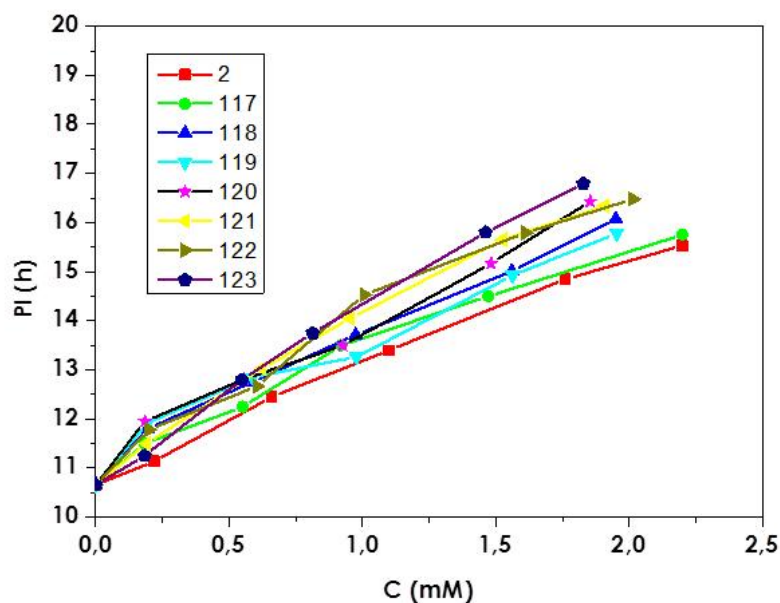
Cabe destacar que sea el propio hidroxitirosol libre (**1**) el que presente la mayor actividad antioxidante, en comparación con sus éteres derivados. Este resultado es explicable teniendo en cuenta la “paradoja polar” (ya comentada en el apartado 2.6.), según la cual los antioxidantes de naturaleza apolar son más eficaces en un ambiente hidrofílico, mientras que los antioxidantes polares son más activos en ambiente lipofílico. Según se ha visto

en el apartado anterior, el hidroxitirosol es el compuesto más polar de todos los ensayados, por lo que no debe extrañar que sea el más activo en un ambiente lipofílico como el utilizado en este ensayo.

No obstante, todos los éteres ensayados presentan una capacidad antioxidante muy similar a la del propio hidroxitirosol, indicando que la incorporación de una cadena alquílica en el hidroxilo alcoholico del mismo no afecta en gran medida a dicha actividad. Por último, indicar que no se observa correlación alguna entre la longitud de la cadena alquílica y la capacidad protectora de estas nuevas sustancias.

#### 5.6.1.2. Método Rancimat®. Derivados de tirosol

El ensayo para este tipo de derivados se ha llevado a cabo, como se ha mencionado anteriormente, empleando como matriz triglicéridica AOV de la variedad *Arbequina*. Además, la temperatura empleada para llevar a cabo el experimento en este caso ha sido de 80°C. Se sembraron cantidades crecientes de antioxidantes entre 0,2 y 2,2 mM. Los resultados se presentan en la figura 25.



**Figura 25.** Estabilidad Rancimat (P.I.) de matrices glicéricas sembradas con cantidades crecientes de tirosol (**2**) y sus éteres derivados **117-123**.

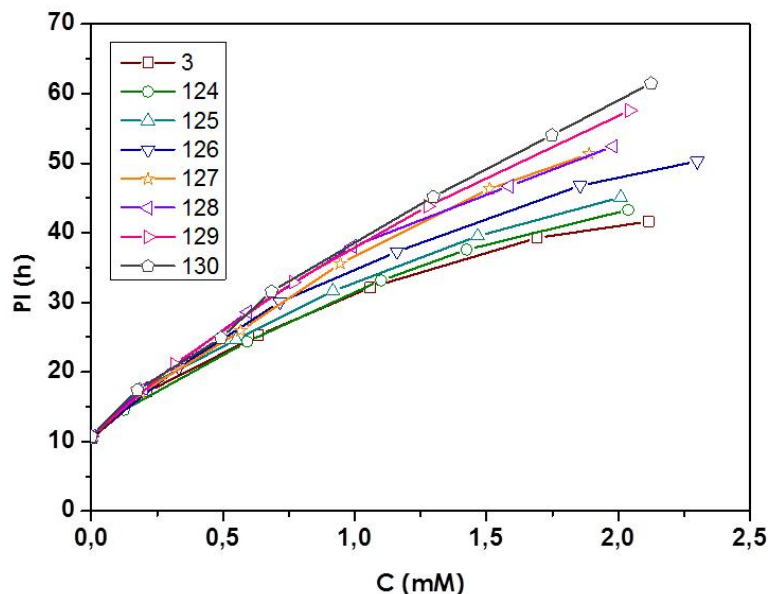
Tal y como se puede observar en la figura y a pesar de suavizar las condiciones del ensayo (matriz triglicéridica menos insaturada y menor temperatura), este tipo de derivados presenta una capacidad de protección de la matriz muy baja con períodos de inducción (P.I.) muy cortos, debido a la ausencia de uno de los grupos *OH* respecto al hidroxitirosol y sus derivados. Este hecho pone de manifiesto la importancia que tiene la presencia de la unidad *orto*-difenólica sobre la capacidad protectora que se atribuye a este tipo de derivados.

Por otro lado cabe destacar que ninguno de estos derivados (**117-123**) posee mayor actividad que el BHT (**150**) y el  $\alpha$ -tocoferol (**151**), tal y como se muestra más adelante (figura 27). Además, en contraposición a los resultados obtenidos para el caso de los derivados de hidroxitirosol, todos los derivados de tirosol proporcionan mayor estabilidad a la matriz que el propio tirosol libre, si bien los P.I. son muy similares.



### 5.6.1.3. Método Rancimat®. Derivados de alcohol homovanílico

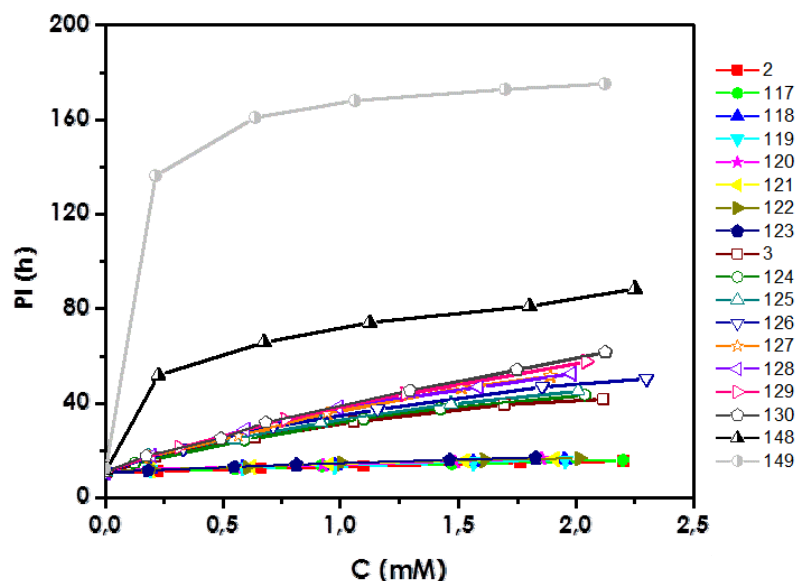
El ensayo para los derivados del alcohol homovanílico (**124-130**) se llevó a cabo en las mismas condiciones que para el tirosol y sus derivados. Los resultados se muestran en la figura 26.



**Figura 26.** Estabilidad Rancimat (P.I.) de matrices glicéridicas sembradas con cantidades crecientes de alcohol homovanílico (**3**) y sus éteres derivados **124-130**.

Como se puede observar en la misma, la protección ofrecida por este tipo de derivados es mayor que aquella que ofrecen los derivados de tirosol. Sin embargo, es inferior a la que ofrecen los derivados de hidroxitirosol. Estos resultados pueden parecer extraños ya que cabría esperar que fuesen parecidos a los obtenidos por la serie del tirosol; sin embargo y, a pesar del hecho de presentar la unidad *orto*-difenólica bloqueada por un grupo *metoxi* en posición *orto* respecto al *OH* fenólico que podría afectar a la actividad, dicho grupo resulta poseer una influencia positiva sobre la actividad de estos derivados, de acuerdo con la estabilización a la que el radical fenoxilo se ve afectado por sustituciones en posición *orto* con grupos donadores de electrones, tal y como ocurre en este caso<sup>143, 209</sup>.

Al igual que ocurre con los derivados de tirosol, y como se puede observar en la figura 27, los derivados de alcohol homovanílico poseen períodos de inducción inferiores a las sustancias empleadas como patrones, BHT (**150**) y  $\alpha$ -tocoferol (**151**), pero superiores a los del propio alcohol homovanílico (**3**) libre.



**Figura 27.** Estabilidad Rancimat (P.I.) de matrices glicéricas sembradas con cantidades crecientes de los compuestos **117-130**.

Si se comparan los datos obtenidos para las tres series de derivados, se puede observar una clara relación entre la estructura de los compuestos y la actividad antioxidante, de manera que el hidroxitirosol y sus derivados (**1**, **107-112**, **114**, **116**) por el hecho de poseer la unidad *orto*-difenólica intacta en sus estructuras son los que presentan mayor actividad. Por el contrario, el tirosol y sus derivados (**2**, **117-123**), al poseer sólo uno de los dos *OH* fenólicos en sus estructuras apenas tienen actividad. La serie del alcohol homovanílico y sus derivados (**3**, **124-130**) ofrecen una protección a la matriz triglicéridica intermedia.

### 5.6.2. Método FRAP (*Ferric Reducing/antioxidant power*)

Una vez evaluada la estabilidad oxidativa de los compuestos objeto de estudio en la presente Memoria en matrices lipídicas, se procedió al estudio de su actividad antioxidante mediante un método de evaluación basado en mecanismos de transferencia de electrones (ET) del antioxidante como es el método *FRAP*. Este método se ha desarrollado para determinar la capacidad reductora de compuestos puros en soluciones metanólicas por espectrofotometría UV-visible. El complejo tripiridiltriazina (TPTZ)-Fe (III) es reducido por los antioxidantes a su forma ferrosa, desarrollando un intenso color azul con una absorción máxima a 595nm (véase apartado 4.5.6.). El aumento de absorbancia resulta proporcional a la capacidad reductora del antioxidante y por tanto a su potencial antioxidante<sup>206</sup>.

El ensayo se ha llevado a cabo empleando diferentes concentraciones metanólicas comprendidas entre 100 y 500  $\mu\text{M}$  para los derivados de HTy, entre 500 y 10000  $\mu\text{M}$  para los derivados de Ty y entre 100 y 800  $\mu\text{M}$  para los derivados de HMV. Cada compuesto ha sido analizado por triplicado. La relación lineal obtenida entre la absorbancia de la mezcla de reacción medida a 595nm con la concentración de cada compuesto en el intervalo especificado, proporciona una recta de calibrado cuyos coeficientes de correlación ( $r^2$ ) próximos a la unidad, dan idea de la efectiva correlación entre ambos parámetros.

Los resultados se han expresado como Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox (TEAC, mM), que se define como la concentración de Trolox expresada en mM con una actividad antioxidante equivalente a 1mM de disolución del antioxidante problema, de manera que a mayor equivalente de Trolox, mayor actividad antioxidante del compuesto evaluado.

## 5.6.2.1. Método FRAP. Derivados de hidroxitirosol

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores y, dados los resultados mostrados en la tabla 16, se puede observar cómo el hidroxitirosol libre (**1**) muestra menor actividad antioxidante en comparación con sus éteres derivados (**107-112, 114, 116**). Además, no se observan diferencias significativas entre los valores obtenidos para los éteres estudiados.

**Tabla 16.** Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método FRAP de los compuestos **1, 107-112, 114, 116** y su comparación con BHT y tocoferol.

Compuesto	mM TEAC*
<b>1</b>	1,39 ± 0,05 <sup>b, c</sup>
<b>107</b>	2,14 ± 0,07 <sup>f</sup>
<b>108</b>	2,40 ± 0,08 <sup>g</sup>
<b>109</b>	2,03 ± 0,07 <sup>e, f</sup>
<b>110</b>	1,90 ± 0,06 <sup>d</sup>
<b>111</b>	1,95 ± 0,06 <sup>d, e</sup>
<b>112</b>	1,50 ± 0,06 <sup>c</sup>
<b>114</b>	1,49 ± 0,05 <sup>c</sup>
<b>116</b>	1,45 ± 0,05 <sup>c</sup>
<b>BHT</b>	1,32 ± 0,05 <sup>b</sup>
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	0,80 ± 0,04 <sup>a</sup>

\* Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos replicados. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, comparando la actividad mostrada por el hidroxitirosol y sus derivados con respecto a los antioxidantes comúnmente empleados como patrones, BHT (**150**) y  $\alpha$ -tocoferol (**151**), se observa que la menor actividad corresponde al  $\alpha$ -tocoferol si bien el BHT también posee un valor inferior al del hidroxitirosol y sus derivados.

Por último, indicar que, los resultados obtenidos están nuevamente de acuerdo con la “paradoja polar”, ya que la introducción de la cadena alquílica lateral en el hidroxitirosol produce un aumento en la lipofilia, lo que conlleva un aumento en la actividad de estos compuestos en el medio polar

empleado en este tipo de método. Al contrario de lo que ocurría con el ensayo Rancimat® que tiene lugar en un medio lipofílico, en este caso al realizarse este ensayo en un medio polar el hidroxitirosol libre posee menos actividad que sus derivados lipofílicos.

#### 5.6.2.2. Método FRAP. Derivados de tirosol

El ensayo se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que para el hidroxitirosol y sus derivados. Los resultados se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17.** Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método FRAP de los compuestos **2**, **117-123** y su comparación con BHT y tocoferol.

Compuesto	mM TEAC*
<b>2</b>	0,31 ± 0,03 <sup>c</sup>
<b>117</b>	0,16 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>118</b>	0,18 ± 0,03 <sup>b</sup>
<b>119</b>	0,16 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>120</b>	0,16 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>121</b>	0,15 ± 0,02 <sup>a, b</sup>
<b>122</b>	0,11 ± 0,02 <sup>a</sup>
<b>123</b>	0,11 ± 0,02 <sup>a, b</sup>
<b>BHT</b>	1,32 ± 0,05 <sup>e</sup>
<b><i>α</i>-Tocoferol</b>	0,80 ± 0,04 <sup>d</sup>

\* Los resultados representan la media ± desviación estándar de tres experimentos replicados. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Del análisis de los resultados se deriva que, como ya se vió en el ensayo Rancimat®, este tipo de derivados posee una escasa o nula actividad antioxidante, debido a la falta del segundo OH fenólico en sus estructuras. Incluso, como se puede observar en la tabla 17, la introducción de una cadena alquílica lateral en el tirosol, no sólo no produce un aumento de la actividad sino que ésta disminuye.

Además, las sustancias empleadas como patrones BHT y  $\alpha$ -Tocoferol poseen mayor actividad que este tipo de derivados e, incluso más que el propio tirosol libre.

### 5.6.2.3. Método FRAP. Derivados de alcohol homovanílico

Al igual que para los derivados ya estudiados, el ensayo FRAP para el alcohol homovanílico (**3**) y sus derivados (**124-130**) se lleva a cabo en las condiciones ya descritas. Los resultados se muestran en la tabla 18.

**Tabla 18.** Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método FRAP de los compuestos **3**, **124-130** y su comparación con BHT y tocoferol.

Compuesto	mM TEAC*
<b>3</b>	1,44 $\pm$ 0,02 <sup>f, g</sup>
<b>124</b>	1,47 $\pm$ 0,03 <sup>g</sup>
<b>125</b>	1,60 $\pm$ 0,03 <sup>h</sup>
<b>126</b>	1,61 $\pm$ 0,03 <sup>h</sup>
<b>127</b>	1,41 $\pm$ 0,03 <sup>e, f</sup>
<b>128</b>	1,37 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>
<b>129</b>	1,05 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>
<b>130</b>	0,87 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
<b>BHT</b>	1,32 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	0,80 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>

\* Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos replicados. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Como se puede observar en la tabla 18 estos derivados presentan una actividad antioxidante intermedia entre lo obtenido para los derivados de hidroxitirosol y para los de tirosol. Como ya se ha mencionado anteriormente, se podría esperar una capacidad inferior al poseer estos derivados la unidad *orto*-difenoica bloqueada por un grupo *metoxi*. Sin embargo, es el propio

grupo *metoxi* el que posee una influencia positiva sobre la actividad de este tipo de derivados (Ver apartado 5.3.1.3.).

Cabe destacar además, que la actividad del alcohol homovanílico libre (**3**) para este método es superior que la del propio hidroxitirosol (**1**), si bien la diferencia no es notable. Además, todos los derivados analizados en este caso, junto con su precursor libre, poseen actividades superiores a las que presentan las sustancias comúnmente empleadas como antioxidantes BHT (**150**) y  $\alpha$ -tocoferol (**151**).

En este caso los resultados vuelven a estar de acuerdo con la “*paradoja polar*”, ya que el aumento de la lipofilia del alcohol homovanílico (**3**) se traduce en un aumento de la actividad antioxidante, aunque este aumento no es lineal, sino que el comportamiento es variable en función de la longitud de la cadena alquílica que se introduce.

Analizando los resultados que presentan las tres series de compuestos en estudio, se vuelve a encontrar una clara relación entre la estructura y la actividad de estos compuestos. Así, el hidroxitirosol y sus derivados poseen una mayor actividad antioxidante, mientras que el tirosol y sus derivados son los que peor actividad presentan. La actividad que ofrecen el alcohol homovanílico y sus derivados es intermedia a la que presentan las series del HTy y del Ty, si bien como ya se ha mencionado, el alcohol homovanílico libre posee en este caso una actividad ligeramente superior a la del hidroxitirosol libre. Se observa en todos los casos una leve tendencia a valores máximos en la actividad antioxidante en los primeros términos de cada serie (con cadenas de metilo, etilo, propilo y butilo), disminuyendo ésta notablemente en los compuestos de cadena alquílica de mayor longitud.

### **5.6.3. Método ABTS**

Este método está también basado en mecanismos de transferencia de electrones del antioxidante. La medida se basa en la disminución de la absorbancia a 730 nm a 30 °C del catión radical ABTS<sup>•+</sup>, un cromóforo verde-azulado que se reduce en presencia de antioxidante perdiendo color proporcionalmente.

Los resultados que se presentan son la media de tres determinaciones y se expresan, al igual que para el ensayo FRAP, como Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox (TEAC, mM).

#### *5.6.3.1. Método ABTS. Derivados de hidroxitirosol*

Se ha evaluado la actividad antioxidante de los compuestos (**107-112**, **114**, **116**) y se ha comparado con el hidroxitirosol libre (**1**), BHT (**150**) y  $\alpha$ -tocoferol (**151**). Los resultados se presentan en la tabla 19.



**Tabla 19.** Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS de los compuestos **1**, **107-112**, **114**, **116** y su comparación con BHT y tocoferol.

Compuesto	mM TEAC*
<b>1</b>	0,84 ± 0,02 <sup>c</sup>
<b>107</b>	1,22 ± 0,02 <sup>f</sup>
<b>108</b>	1,03 ± 0,02 <sup>e</sup>
<b>109</b>	0,95 ± 0,02 <sup>d</sup>
<b>110</b>	0,95 ± 0,02 <sup>d</sup>
<b>111</b>	1,22 ± 0,02 <sup>f</sup>
<b>112</b>	0,81 ± 0,02 <sup>c</sup>
<b>114</b>	0,77 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>116</b>	0,82 ± 0,02 <sup>c</sup>
<b>BHT</b>	0,27 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>α-tocoferol</b>	1,01 ± 0,02 <sup>e</sup>

\* Los resultados representan la media ± desviación estándar de tres experimentos replicados. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Según se puede observar en la tabla 19, el hecho de introducir la cadena alquílica en este tipo de derivados produce un aumento en la actividad antioxidante, si bien son aquellos derivados con la cadena alquílica más corta (**107-111**) en los que se produce un mayor aumento en la actividad. Para el resto de compuestos sintetizados la actividad se ve disminuida a valores cercanos a los que presenta el hidroxitirosol libre.

En cualquier caso, la mayoría de los derivados objeto de estudio presentan actividades superiores a la del hidroxitirosol libre (**1**), lo cual es lógico si se tiene en cuenta que el medio en el cual se realiza la determinación es polar, de acuerdo con la ya mencionada “paradoja polar”.

Comparando los resultados obtenidos para estos derivados con las sustancias empleadas comúnmente como patrones, BHT (**150**) y α-tocoferol (**151**), se puede observar que, en general, los derivados sintetizados presentan una actividad antioxidante superior a ambos. La diferencia se ve acentuada en el caso concreto del BHT cuya actividad antioxidante es muy pobre medida por este método.

## 5.6.3.2. Método ABTS. Derivados de tirosol

Tal y como se muestra en la tabla 20, se ha evaluado la actividad antioxidante de los compuestos **117-123** y se ha comparado con las sustancias comúnmente empleadas como antioxidantes BHT (**150**) y  $\alpha$ -tocoferol (**151**), junto con el propio tirosol (**2**) libre.

**Tabla 20.** Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS de los compuestos **2, 117-123** y su comparación con BHT y tocoferol.

Compuesto	mM TEAC*
<b>2</b>	0,39 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>
<b>117</b>	0,30 $\pm$ 0.01 <sup>c, d</sup>
<b>118</b>	0,37 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>
<b>119</b>	0,31 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
<b>120</b>	0,29 $\pm$ 0.01 <sup>b, c</sup>
<b>121</b>	0,30 $\pm$ 0.02 <sup>c, d</sup>
<b>122</b>	0,30 $\pm$ 0.01 <sup>c, d</sup>
<b>123</b>	0,18 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
<b>BHT</b>	0,27 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	1,01 $\pm$ 0,02 <sup>f</sup>

\* Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos replicados. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Al igual que se puede observar en los ensayos anteriores, en este caso se repite el hecho que el tirosol y sus derivados poseen una escasa actividad antioxidante debido a la ausencia de la unidad orto-difenólica en sus estructuras.

Se puede observar cómo el hecho de introducir una cadena alquílica lateral no se traduce en un aumento en la actividad. Incluso el  $\alpha$ -tocoferol (**151**) es el compuesto que mayor capacidad de captación de radicales libres posee, más incluso que el tirosol libre (**2**).

## 5.6.3.3. Método ABTS. Derivados de alcohol homovanílico

En la tabla 21 se presenta la capacidad de captación de radicales libres para los compuestos **124-130** junto con la que presentan su precursor, el alcohol homovanílico (**3**), y el BHT (**150**) y el  $\alpha$ -tocoferol (**151**).

**Tabla 21.** Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS de los compuestos **3, 124-130** y su comparación con BHT y tocoferol.

Compuesto	mM TEAC*
<b>3</b>	1,29 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>
<b>124</b>	1,37 $\pm$ 0,01 <sup>g</sup>
<b>125</b>	1,32 $\pm$ 0,01 <sup>f</sup>
<b>126</b>	1,49 $\pm$ 0,02 <sup>h</sup>
<b>127</b>	1,33 $\pm$ 0,01 <sup>f</sup>
<b>128</b>	1,27 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>
<b>129</b>	1,06 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
<b>130</b>	1,13 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>
<b>BHT</b>	0,27 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	1,01 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>

\* Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos replicados. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

En los resultados que se presentan se repite lo que ocurre en el ensayo FRAP, los derivados de alcohol homovanílico presentan una actividad antioxidante muy por encima de la que presentan los de tirosol. Incluso poseen una actividad superior a la de los derivados de hidroxitirosol, hecho que puede extrañar ya que este tipo de derivados presentan la unidad *orto*-difenólica bloqueada por un grupo *metoxi* como ya se ha mencionado anteriormente. Llama igualmente la atención que el alcohol homovanílico libre (**3**) presente una mayor actividad que el propio hidroxitirosol libre (**1**).

Se encuentran resultados similares a los aquí presentados en estudios recientes. Así, se ha llevado a cabo la evaluación de la capacidad de

captación de radicales libres mediante el método DPPH del ácido sinápico, que presenta en el anillo aromático dos grupos *metoxi* y un grupo *OH* entre ambos, y sus correspondientes metil, etil, propil y butil ésteres derivados<sup>210</sup>. En dicho estudio se encuentra que el ácido sinápico libre tiene una menor capacidad de captación de radicales libres que sus cuatro ésteres derivados en estudio. Esta tendencia concuerda con la que se puede encontrar en los resultados para el método ABTS aquí presentados en la serie del alcohol homovanílico y sus éteres derivados, en los cuales se puede observar que los metil, etil, propil y butil éteres derivados de HMV presentan mayor actividad que el propio alcohol libre, encontrándose un descenso en la actividad a partir del hexil éter de HMV, tendencia similar a la descrita en el método anteriormente comentado.

#### **5.6.4. Método ORAC (Oxygen Radical Scavenging Capacity)**

Este método para la determinación de la capacidad de secuestro de radicales libres se basa en la disminución de fluorescencia que se produce tras añadir a la molécula de fluoresceína un generador de radicales libres, como es el (AAPH), que genera radicales peroxilo. En presencia de un antioxidante esta pérdida de fluorescencia resulta menor cuanto mayor sea la capacidad antioxidante del compuesto evaluado.

Los resultados son la media de tres determinaciones y se expresan como  $\mu\text{moles TROLOX} / \mu\text{moles de compuesto}$ .

##### **5.6.4.1. Método ORAC. Derivados de hidroxitirosol**

Los resultados recogidos en la tabla 22 presentan los valores ORAC para los derivados **107-112**, **114** y **116** además del propio hidroxitirosol libre (**1**) y las sustancias comúnmente empleadas como patrones BHT (**150**) y  $\alpha$ -tocoferol (**151**).

**Tabla 22.** Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ORAC de los compuestos **1**, **107-112**, **114**, **116** y su comparación con BHT y tocoferol.

Compuesto	Valor ORAC*
<b>1</b>	1,92 ± 0,04 <sup>n</sup>
<b>107</b>	2,20 ± 0,04 <sup>p</sup>
<b>108</b>	2,02 ± 0,05 <sup>o</sup>
<b>109</b>	2,04 ± 0,05 <sup>o</sup>
<b>110</b>	1,90 ± 0,06 <sup>n</sup>
<b>111</b>	2,02 ± 0,05 <sup>o</sup>
<b>112</b>	1,94 ± 0,04 <sup>n, o</sup>
<b>114</b>	1,73 ± 0,05 <sup>m</sup>
<b>116</b>	1,66 ± 0,04 <sup>m</sup>
<b>BHT</b>	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	0,63 ± 0,06 <sup>c, d, e</sup>

\* Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos replicados. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Según se puede observar en la tabla 22, la introducción de la cadena alquílica en este tipo de derivados produce un aumento en la actividad antioxidante, si bien son aquellos derivados con la cadena alquílica más corta (**107-111**) en los que se produce un mayor aumento en la actividad, fundamentalmente en el *metil* derivado (**107**). Para el resto de compuestos sintetizados la actividad se ve disminuida a valores cercanos e incluso inferiores a los que presenta el hidroxitirosol libre.

Estos resultados ofrecen una tendencia muy similar a los obtenidos para los mismos derivados en los anteriores ensayos FRAP y ABTS.

En cualquier caso, todos los derivados sintetizados, además de su precursor libre, muestran una capacidad de secuestro de radicales libres muy

por encima de la que presentan el BHT (**150**) y  $\alpha$ -tocoferol (**151**), siendo el BHT el que peor resultado ofrece.

#### 5.6.4.2. Método ORAC. Derivados de tirosol

Tal y como se muestra en la tabla 23, se ha evaluado la actividad antioxidante de los compuestos **117-123** y se ha comparado con las sustancias comúnmente empleadas como antioxidantes BHT (**150**) y  $\alpha$ -tocoferol (**151**), junto con el propio tirosol (**2**) libre.

**Tabla 23.** Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ORAC de los compuestos **2, 117-123** y su comparación con BHT y tocoferol.

Compuesto	Valor ORAC*
<b>2</b>	0,79 $\pm$ 0,04 <sup>f</sup>
<b>117</b>	0,57 $\pm$ 0,06 <sup>b, c</sup>
<b>118</b>	0,47 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
<b>119</b>	0,64 $\pm$ 0,05 <sup>c, d</sup>
<b>120</b>	0,69 $\pm$ 0,05 <sup>d, e</sup>
<b>121</b>	0,62 $\pm$ 0,02 <sup>c, d</sup>
<b>122</b>	0,69 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>
<b>123</b>	0,68 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>
<b>BHT</b>	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	0,63 $\pm$ 0,06 <sup>c, d, e</sup>

\* Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos replicados. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Los resultados están de acuerdo con los obtenidos en los anteriores ensayos para estos derivados, es decir, los derivados de tirosol así como el propio tirosol libre presentan una escasa actividad antioxidante, debido, como ya se ha mencionado anteriormente, a que en sus estructuras no está presente la unidad *orto*-difenólica.

De nuevo se puede observar cómo los derivados sintetizados poseen menor actividad que el tirosol libre. En cualquier caso, y a pesar de la escasa capacidad ofrecida, estos derivados poseen mayor actividad antioxidante para este ensayo que el BHT (**150**) y muy parecida a la del  $\alpha$ -tocoferol (**151**).

#### 5.6.4.3. Método ORAC. Derivados de alcohol homovanílico

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 24. En ésta se puede observar cómo los derivados a los que se les ha introducido una cadena alquílica más corta (**124-126**), son los que mayor actividad presentan. En los siguientes derivados (**127-130**), la actividad disminuye hasta valores inferiores al que presenta el alcohol homovanílico libre (**3**).

**Tabla 24.** Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ORAC de los compuestos **3**, **124-130** y su comparación con BHT y tocoferol.

Compuesto	Valor ORAC*
<b>3</b>	1,15 $\pm$ 0,04 <sup>i, j</sup>
<b>124</b>	1,36 $\pm$ 0,01 <sup>l</sup>
<b>125</b>	1,25 $\pm$ 0,04 <sup>k</sup>
<b>126</b>	1,33 $\pm$ 0,04 <sup>k, l</sup>
<b>127</b>	1,09 $\pm$ 0,04 <sup>h, i</sup>
<b>128</b>	1,18 $\pm$ 0,02 <sup>j</sup>
<b>129</b>	1,04 $\pm$ 0,05 <sup>h</sup>
<b>130</b>	0,92 $\pm$ 0,02 <sup>g</sup>
<b>BHT</b>	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	0,63 $\pm$ 0,06 <sup>c, d, e</sup>

\* Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos replicados. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Como viene sucediendo en todos los ensayos estudiados, estos derivados poseen una actividad antioxidante superior a la que presentan los derivados de tirosol.

Cabe destacar el comportamiento no lineal observado en estos derivados y que está de acuerdo con los resultados descritos previamente para los ésteres de hidroxitirosol y tirosol<sup>32</sup> y para los éteres de hidroxitirosol, ya presentados en este mismo capítulo<sup>33</sup>. Estos resultados coinciden con aquéllos obtenidos tras la evaluación de la actividad antioxidante de ésteres del ácido clorogénico<sup>211</sup> y de ésteres del ácido rosmarínico<sup>212</sup>, en los que tampoco se encuentra una relación lineal entre la actividad antioxidante y el aumento de la lipofilia de dichas sustancias. Además, en ensayos de los mismos ésteres del ácido clorogénico<sup>213</sup> en fibroblastos, se encuentra igualmente que el aumento de la cadena alquílica no se traduce obligatoriamente en un aumento lineal de la actividad antioxidante, encontrándose para este caso concreto un máximo de actividad para una longitud de cadena de 12 átomos de carbono.

Comparando las actividades presentadas por las tres series de derivados, se puede observar una clara relación estructura-actividad antioxidante de manera que aquellos derivados que presentan la unidad *orto*-difenólica intacta en sus estructuras son los que mayor actividad poseen. Por otro lado, aquellos derivados que poseen un solo *OH* fenólico, poseen una actividad antioxidante muy baja. Por el contrario, en aquellos derivados que presentan la unidad *orto*-difenólica bloqueada por un grupo *metoxi*, la actividad no es tan baja como cabría esperar, tal y como ya se ha descrito anteriormente.

### **5.7. Evaluación de la actividad antioxidante de los derivados de hidroxitirosol en glóbulos rojos**

Se ha llevado a cabo la determinación de la actividad biológica de los derivados de hidroxitirosol (**107-116**). Para ello se ha empleado sangre de voluntarios humanos procedente del "Centro TrASFusionale" del Hospital de Urbino (Italia). Las muestras fueron tratadas de manera que los ensayos se realizaron exclusivamente sobre glóbulos rojos (*ver apartado 4.6.*).



Se escogieron los glóbulos rojos humanos como modelos metabólicos simples. En estas células los mecanismos de defensa mediados por la inducción de síntesis de proteínas no están operativos, de manera que están expuestos al daño oxidativo debido a la función que ejercen como transportadores de oxígeno<sup>113</sup>.

Para evaluar la actividad biológica de estos derivados, se han llevado a cabo dos ensayos de oxidación de eritrocitos determinándose dos parámetros que dan idea de la actividad antioxidante que poseen estos compuestos sobre las células objeto del estudio. Dichos parámetros son, por un lado, la determinación de la producción de malondialdehído (MDA) que se empleará para la evaluación de la lipoperoxidación lipídica de la membrana de los glóbulos rojos y, por otro lado, la determinación de la hemólisis oxidativa de estas células.

#### *5.7.1. Evaluación de la lipoperoxidación lipídica de la membrana de los glóbulos rojos*

El MDA es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica, por lo que su detección es indicativa de la existencia de un daño oxidativo en las células.

Para llevar a cabo el ensayo se forzó la peroxidación lipídica de la membrana de los glóbulos rojos empleando para ello *tert*-butilhidroperóxido (*t*-BOOH) como agente inductor<sup>206</sup>. Previamente se adicionaron los alquil éteres de hidroxitirosol (**107-116**) a dos concentraciones conocidas, 40 y 80  $\mu\text{M}$ .

Los resultados obtenidos fueron comparados con un control que no fue tratado con los antioxidantes. Además, se llevó a cabo la determinación para el propio hidroxitirosol libre (**1**) y dos sustancias patrón como son el BHT (**141**) y el Trolox (**142**).

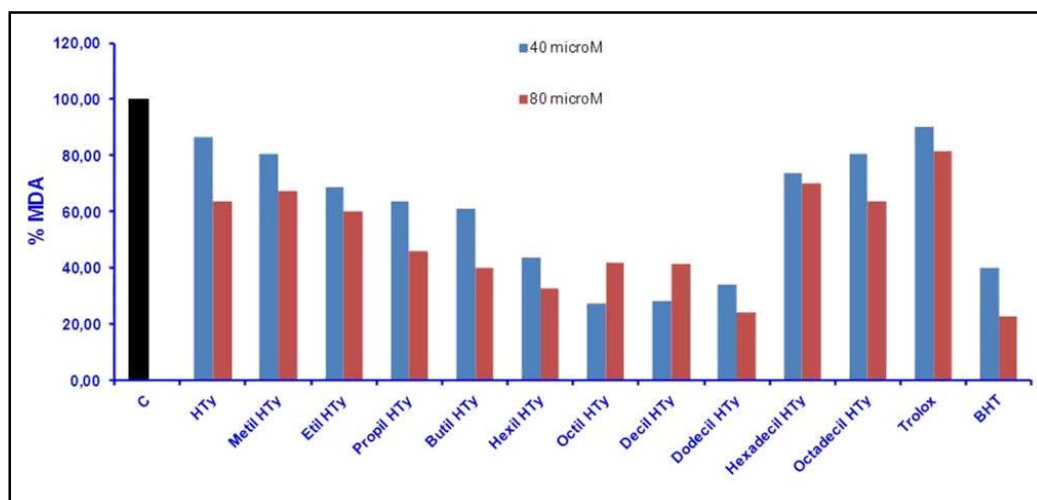
Los resultados se recogen en la tabla 24 y representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos replicados.

**Tabla 25.** Determinación de la capacidad antioxidante mediante la determinación de MDA de los compuestos **1**, **107-116** y su comparación con BHT y Trolox.

Compuesto	%MDA (40 $\mu$ M)	%MDA (80 $\mu$ M)
<i>Control</i>	100,00	100,00
<b>1</b>	86,45	63,93
<b>107</b>	80,40	67,25
<b>108</b>	68,65	60,00
<b>109</b>	63,87	46,17
<b>110</b>	61,10	39,87
<b>111</b>	43,83	32,77
<b>112</b>	27,17	42,13
<b>113</b>	28,20	41,50
<b>114</b>	34,00	24,00
<b>115</b>	73,87	70,15
<b>116</b>	80,80	63,65
<i>Trolox</i>	90,00	81,47
<i>BHT</i>	40,20	22,97

Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos replicados.

A diferencia de lo que ocurre en los ensayos químicos de actividad antioxidante, en los que un aumento en la lipofilia del hidroxitirosol se traduce en un aumento de la actividad sin que haya tendencia alguna en dicho aumento, en este caso se puede observar un comportamiento parabólico de los resultados, tal y como se muestra en la figura 28, de manera que la capacidad antioxidante de los compuestos analizados va en aumento hasta un máximo de actividad, que en este caso corresponde al octil hidroxitirosol (**112**) para una concentración de 40  $\mu$ M y al dodecil hidroxitirosol (**114**) para 80  $\mu$ M, produciéndose un descenso a continuación hasta alcanzar un mínimo en el octadecil hidroxitirosol (**116**) en ambas concentraciones.



**Figura 28.** Producción de MDA en glóbulos rojos tratados con hidroxitirosol y sus éteres.

Los derivados que presentan valores máximos de actividad antioxidante poseen un CLogP entre 4 y 5. Estos valores se acercan a los que se proponen por Cena y col.<sup>214</sup> como valores óptimos de CLogP para que una sustancia sea considerada como un buen antioxidante.

### 5.7.2. Determinación de la hemólisis oxidativa

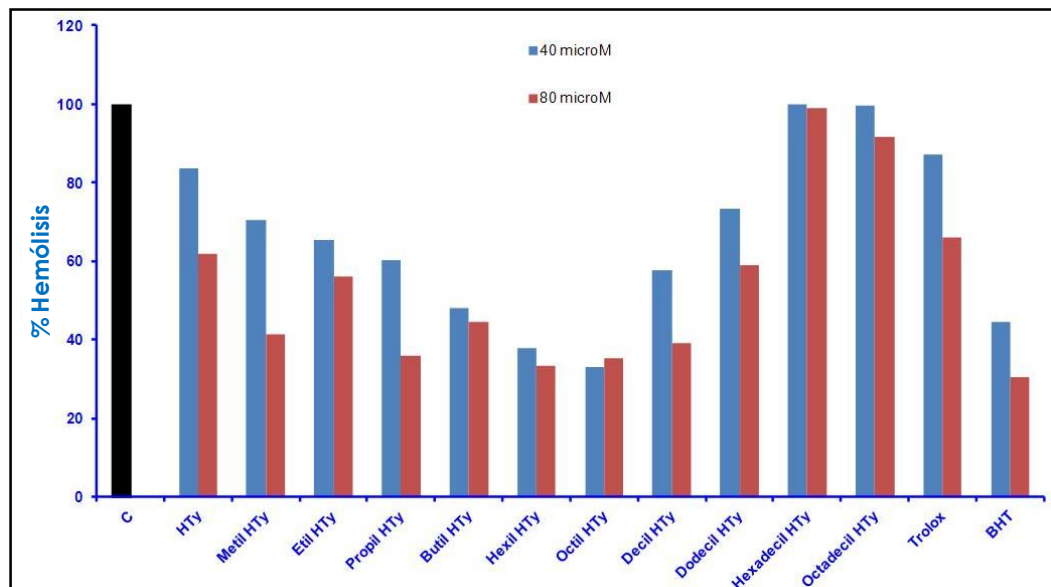
Por otra parte, se ha evaluado el efecto protector frente a la hemólisis oxidativa de los nuevos derivados sintetizados de hidroxitirosol en glóbulos rojos humanos. Para ello, se han incubado las células con concentraciones conocidas de 40 y 80  $\mu\text{M}$  de los compuestos en estudio, junto con el radical AAPH, una sustancia generadora de radicales peroxilo. Los resultados se recogen en la tabla 25 y representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos replicados. Además, se han empleado como sustancias patrón BHT y Trolox.

**Tabla 26.** Efecto de los compuestos **107-116** sobre la cinética de hemólisis (%) en glóbulos rojos inducida por AAPH.

Compuesto	% Hemólisis (40 $\mu$ M)	% Hemólisis (80 $\mu$ M)
<i>1</i>	83,67	61,63
<i>103</i>	70,50	41,25
<i>104</i>	65,25	56,10
<i>105</i>	60,33	36,00
<i>106</i>	47,90	44,66
<i>107</i>	37,83	33,33
<i>108</i>	33,03	35,33
<i>109</i>	57,55	39,03
<i>110</i>	73,20	59,00
<i>111</i>	100,00	99,07
<i>112</i>	99,50	91,70
<i>Trolox</i>	87,01	65,96
<i>BHT</i>	44,56	30,56

En este caso, se observa de nuevo un comportamiento parabólico en los resultados obtenidos, presentando un máximo de actividad el octil hidroxitirosol (**112**) para una concentración de 40  $\mu$ M y el hexil hidroxitirosol (**111**) para 80  $\mu$ M. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo de determinación de MDA y, de nuevo, los compuestos que presentan la mayor capacidad protectora presentan un valor de CLogP entre 3 y 5.

A diferencia con el ensayo anterior, en este caso el punto de inflexión de la parábola que se obtiene de los resultados se desplaza hacia la izquierda, es decir, hacia longitudes de cadena lateral inferiores, si bien dichas longitudes siguen siendo de cadena media, entre 6 y 8 átomos de carbono (figura 29).



**Figura 29.** % Hemólisis en glóbulos rojos tratados con hidroxitirosol y sus éteres.

Del estudio de los resultados obtenidos en los ensayos biológicos se puede concluir que existe una relación parabólica entre la actividad antioxidante y la lipofilia de los compuestos, siendo una longitud de cadena media, en torno a ocho átomos de carbono, la óptima para lograr una máxima actividad. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Laguerre y col.<sup>211</sup> en los que se obtiene el mismo comportamiento parabólico en estudios de actividad antioxidante en ésteres lipofílicos del ácido rosmarínico.

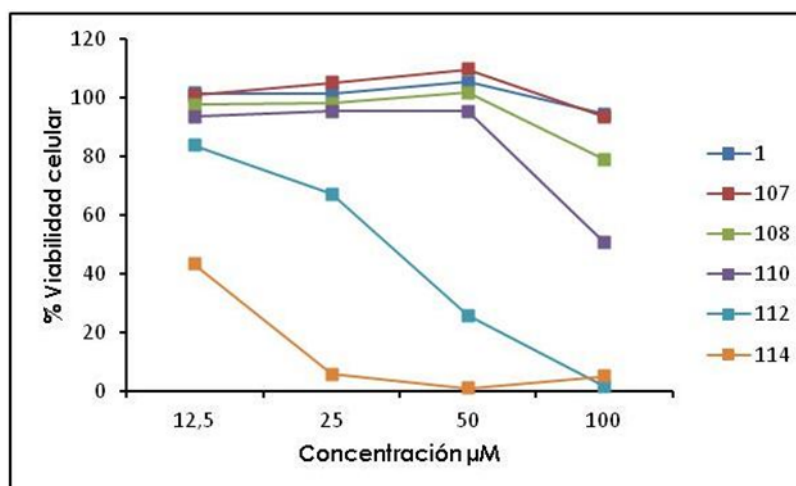
### 5.7.3. Evaluación de la citotoxicidad mediante la técnica MTT

El método *MTT* (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolina)) es una técnica colorimétrica que se basa en la capacidad de las células viables para reducir un compuesto llamado *MTT* a un compuesto coloreado e insoluble denominado *formazan-MTT*, indicativo de la viabilidad celular (Ver apartado 4.8.).

Para llevar a cabo el estudio se han empleado tres líneas celulares de distintos tipos de adenocarcinoma, las cuales se han comparado, en algunos casos, con líneas celulares sanas, como se indica a continuación.

### 5.7.3.1. Ensayo con células HT-29 de adenocarcinoma de colon

Se ha evaluado la viabilidad celular empleando para ello células HT-29 de adenocarcinoma de colon. Los compuestos empleados para realizar el ensayo han sido el propio hidroxitirosol libre (**1**) y los metil (**107**), etil (**108**), butil (**110**), octil (**112**) y dodecil (**114**) éteres de hidroxitirosol. Los resultados, que se presentan en la figura 30, son la media de tres determinaciones  $\pm$  la desviación estándar.



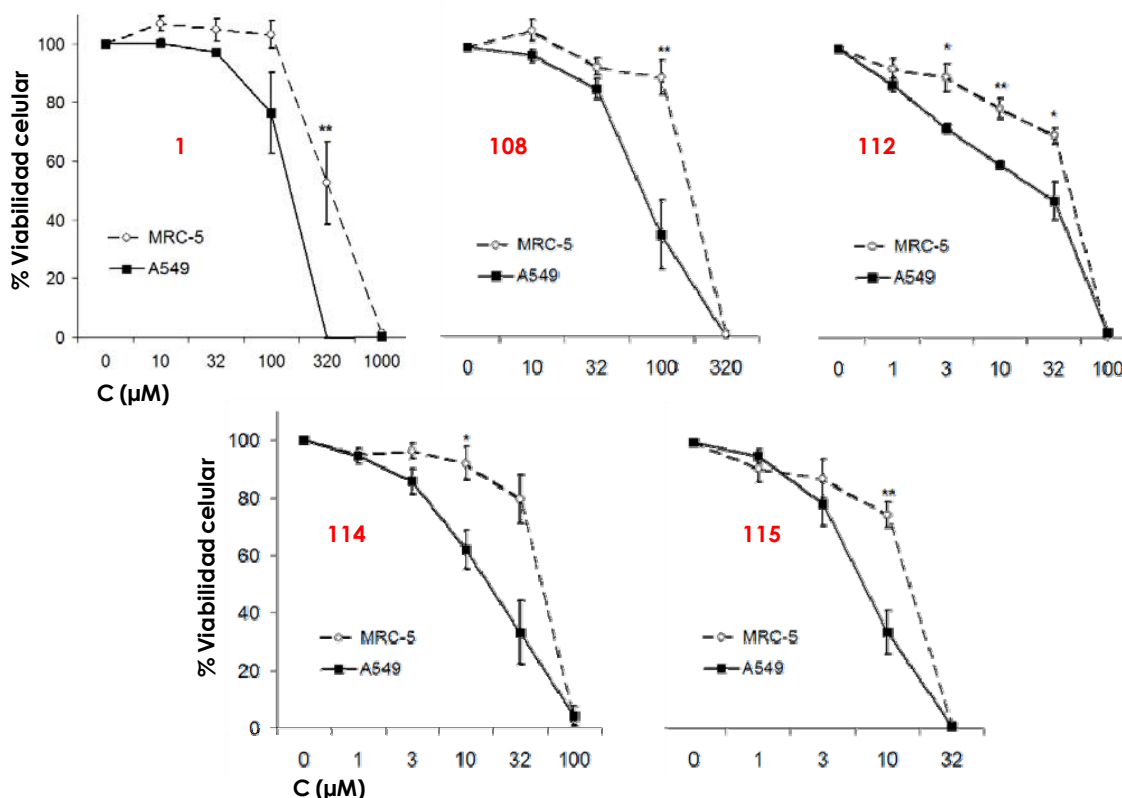
**Figura 30.** Viabilidad celular de los compuestos **1**, **107**, **108**, **110**, **112** y **114** en células HT-29 de adenocarcinoma de colon.

Se puede observar cómo en el caso de los compuestos **1**, **107**, **108** y **110** la viabilidad de las células empleadas es prácticamente del 100% para cualquiera de las concentraciones empleadas. Sin embargo, los compuestos **112** y **114** son los que originan un mayor descenso de la viabilidad celular, fundamentalmente a 50 y 100  $\mu\text{M}$ , si bien es el compuesto **114** el que presenta un mejor perfil para el conjunto de concentraciones empleadas, encontrándose que incluso a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  elimina más del 90% de las células tumorales.

### 5.7.3.2. Ensayo con células A-549 de adenocarcinoma de pulmón

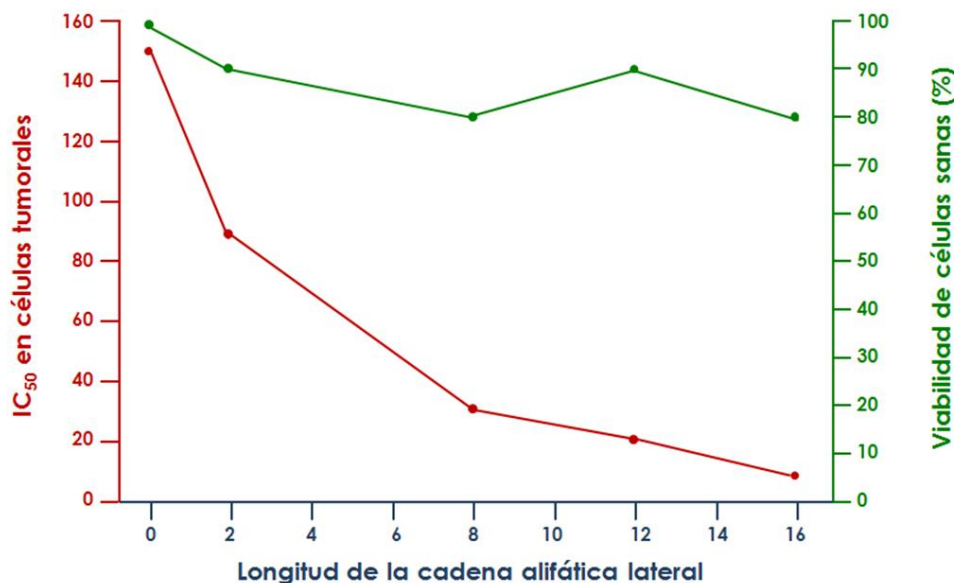
Se ha evaluado tanto la viabilidad celular como la selectividad del hidroxitirosol (**1**) y sus éteres derivados etil (**108**), octil (**112**), dodecil (**114**) y hexadecil (**115**). Para ello se han empleado dos líneas celulares; células sanas de pulmón MRC-5 y células cancerosas de pulmón A-549.

Los resultados, que se presentan en la figura 31, son la media de tres determinaciones  $\pm$  la desviación estándar.



**Figura 31.** Viabilidad celular y selectividad de los compuestos **1**, **108**, **112**, **114** y **116** en células A-549 de adenocarcinoma de pulmón y células sanas de pulmón MRC-5.

En esta figura se puede observar cómo, a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica la  $IC_{50}$ , necesaria para eliminar el 50% de las células tumorales, va disminuyendo de manera lineal. Este hecho se recoge en la figura 32. Así, el hidroxitirosol (**1**) que presenta el *OH* alcohólico libre es el que presenta una  $IC_{50}$  más alta. En el otro extremo encontramos al hexadecil hidroxitirosol (**115**), cuya longitud de cadena es de 16 átomos de carbono y es el que presenta una  $IC_{50}$  más baja de sólo 7  $\mu$ M, el que menos concentración necesita para alcanzar dicha concentración.



**Figura 32.** IC<sub>50</sub> para los compuestos ensayados en la línea celular.

Por otro lado, aunque todos los compuestos ensayados disminuyen también la viabilidad celular de las células sanas, la selectividad que muestran es diversa. Así, el hidroxitirosol muestra una buena selectividad ya que la concentración a la que alcanza su IC<sub>50</sub> para las células cancerígenas tiene una viabilidad del 100% en células sanas, sin embargo dicha IC<sub>50</sub> es elevada, en torno a 147  $\mu\text{M}$ . El resto de compuestos estudiados muestra un buen perfil de selectividad aunque algo inferior al mostrado por el hidroxitirosol, disminuyendo ligeramente la viabilidad de las células sanas como ocurre sobre todo en el caso del octil éter (**112**). Sin embargo, y como se muestra en la figura 32, es el dodecil hidroxitirosol el que presenta un mejor perfil de selectividad ya que la concentración a la que se alcanza su IC<sub>50</sub> (20  $\mu\text{M}$ ) para las células tumorales tan sólo produce un descenso del 10% en la viabilidad de las células sanas.

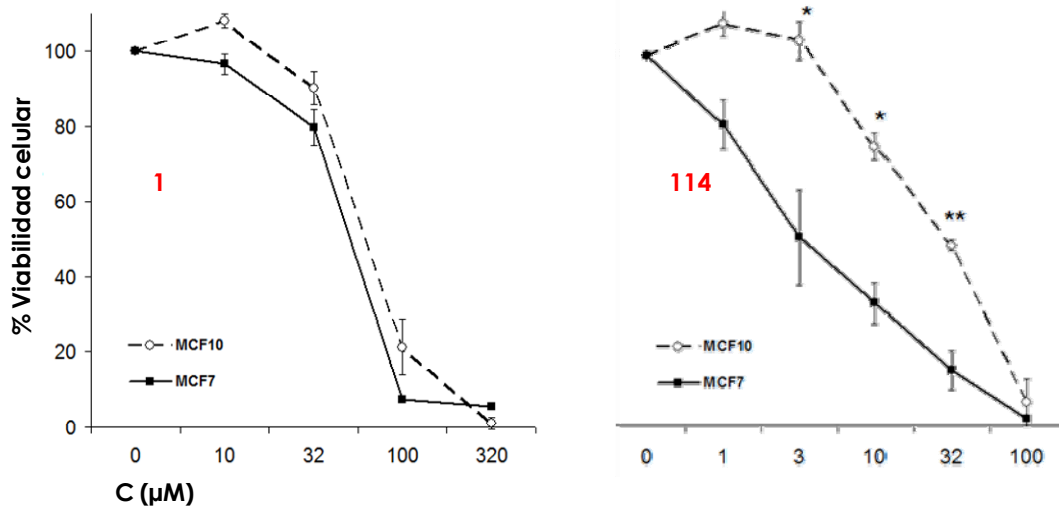
### 5.7.3.3. Ensayo con células MCF-7 de adenocarcinoma de mama

A tenor de los resultados obtenidos en el ensayo con células de adenocarcinoma de pulmón A-549, discutidos en el apartado anterior, se ha



llevado a cabo un ensayo con células *MCF-7* de adenocarcinoma de mama y células sanas de mama *MCF-10* para evaluar la viabilidad celular y la selectividad del dodecil hidroxitirosol (**114**) en comparación con el hidroxitirosol libre. Se eligió este derivado ya que fue el que presentó mejor perfil de selectividad en el ensayo anterior.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 33 y son la media de tres determinaciones  $\pm$  la desviación estándar.



**Figura 33.** Viabilidad celular producida por los compuestos **1** y **114** en células *MCF-7* de adenocarcinoma de mama y células sanas de mama *MCF-10*.

Por la comparación de las gráficas presentadas en la figura 33, se aprecia que el dodecil hidroxitirosol presenta un perfil de selectividad mucho mejor que el hidroxitirosol. La concentración a la que se alcanza la  $IC_{50}$  en el caso de éste ( $50 \mu M$ ), además de ser bastante más elevada que para el dodecil hidroxitirosol ( $4 \mu M$ ), produce la muerte de aproximadamente el 30% de las células sanas. Sin embargo, en el caso del dodecil hidroxitirosol, dicha concentración mantiene un 100% de viabilidad para las células sanas, con lo que se puede decir que el dodecil hidroxitirosol es un excelente candidato para seguir evaluando su potencial efecto antitumoral en este tipo de células.

## ***6. CONCLUSIONS***



## 6. CONCLUSIONS

### First

Synthesis and subsequent evaluation of the biological activity of new derivatives of phenolic compounds present in olive tree (hydroxytyrosol (**1**), tyrosol (**2**)) have been carried out, with alkyl ether structure in which the length of the side alkyl chain varies between one and eighteen carbon atoms for the hydroxytyrosol derivatives and from one to twelve carbon atoms for the tyrosol derivatives. Yields obtained have varied between acceptable and practically quantitative.

### Second

Synthesis and evaluation of the biological activity of new alkyl ethers derived from a hydroxytyrosol metabolite, homovanillic alcohol (**3**) also present in the olive tree, have also been carried out. The side chain length ranges from one to twelve carbon atoms. Likewise, yields obtained have varied between acceptable and practically quantitative.

### Third

Synthesis of a series of alkyl derivatives in which the *ortho*-diphenolic moiety is protected by a methylenedioxy group has been carried out. The potential biological activity of these compounds is of great interest. The length of the side alkyl chain varies again from 1 to 12 carbon atoms.

#### **Fourth**

A new synthetic route for obtaining hydroxytyrosol from commercial tyrosol has been developed. This route consists of four stages in which the yields of obtaining the synthesized substances have been very good. In addition, new orthogonally protected forms of hydroxytyrosol have been obtained.

#### **Fifth**

New synthesized compounds have been characterized by their melting points (solids) and their IR, NMR and ME spectra. Compounds purity have been determined by their elemental analyses.

#### **Sixth**

Lipophilicity of the new synthesized alkyl ethers has been estimated by two different analytical methods; determination of their apolarity Factor (AF) and theoretical calculation of the logarithm of the partition coefficient (ClogP) for each compound using as a tool *ChemBioDraw* (v.12.0). The ordering obtained was very similar in both cases.

#### **Seventh**

Antioxidant activity in lipid matrices by accelerated oxidation Rancimat<sup>®</sup> method has been evaluated. This activity is determined by the chemical structure of the phenolic group being hydroxytyrosyl ethers significantly more active than the corresponding homovanillic alcohol ethers, and these significantly more active than tyrosyl ones. The influence of alkyl chain length on the antioxidant activity varies from one series to other, but does not affect to the activity between compounds of the same series. As for the comparison with

antioxidants often used in the food industry, BHT and  $\alpha$ -tocopherol, these have a significantly lower activity than hydroxytyrosol and its derivatives, but upper than that presented by the series of homovanillic alcohol and tyrosol.

### **Eighth**

Reducing ability/antioxidant capacity by the FRAP method and the ability of free radical scavenging by ABTS and ORAC methods have been evaluated. Results obtained by FRAP and ORAC assays are similar because of the fact that hydroxytyrosol series is offering a significantly upper capacity than that provided by homovanillic alcohol series, and this greater than that offered by the tyrosol series. In addition, for the hydroxytyrosol and homovanillic alcohol series, the new derivatives are even more active than their free precursors. However, results obtained for the ABTS assay reported a change in the trend between the two series, offering homovanillic alcohol derivatives a greater capacity for free radical scavenging than hydroxytyrosyl derivatives. Tyrosol series, in any case, presented the worst behavior.

Substances used as standards, BHT and  $\alpha$ -tocopherol, in almost all cases have a lower activity than the substances studied, although there are differences according to the method used.

### **Ninth**

Hydroxytyrosyl derivatives show a parabolic behavior when their antioxidant activity in red blood cells is evaluated. The optimal length of the alkyl side chain is between eight and twelve carbon atoms, depending on the sample concentration employed for the assay.

**Tenth**

Cell viability as well as selectivity of several hydroxytyrosyl derivatives have been evaluated in three different carcinogenic cell lines. It can be found a better pharmacological profile when the alkyl side chain increase, with a maximum of activity for twelve carbon atoms, corresponding to the dodecyl hydroxytyrosyl derivative.

## ***7. BIBLIOGRAFÍA***





## BIBLIOGRAFÍA

1. Vázquez Roncero, A. Polyphenols of olive oil and their effect on its characteristics, *Rev. Fr. Corps Gras* **1978**, *25*, 21-6.
2. Mateos, R.; Espartero, J.L.; Trujillo, M.; Ríos, J.J.; Leon, M.; Alcudia, F.; Cert, A. Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2185-2192.
3. Albuquerque, J.A.; Gonzalez, J.; Garcia, D.; Cegarra, J. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technol.* **2004**, *91*, 195-200.
4. Arvanitoyannis, I.S.; Kassaveti, A.; Stefanatos, S. Olive oil waste treatment: a comparative and critical presentation of methods, advantages and disadvantages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, *47*, 187-229.
5. Mateos, R.; Domínguez, M.M.; Espartero, J.L.; Cert, A. Antioxidant effect of phenolic compounds,  $\alpha$ -tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *51*, 7170-7175.
6. Servili, M.; Baldioli, M.; Miniati, E.; Montedoro, G. F. Antioxidant activity of new phenolic compounds extracted from virgin olive oil and their interaction with  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene, *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **1996**, *73*, 55-60.
7. Gutiérrez-Rosales, F.; Perdiguero, R.; Gutiérrez, R.; Olías, J.M. Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 394-395.
8. Visioli, F.; Galli, C.; Galli, G.; Caruso, D. Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104*, 677-684.
9. Tuck, K.L.; Hayball, P.J. Major phenolic compounds in olive oil; metabolism and health effects. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 636-644.
10. Bianco, A.; Ramunno, A. The chemistry of *Olea europea*. In *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman, Ed.; Elsevier: The Netherlands, **2006**; Vol. 33, pp. 859-903.
11. Covas, M.I.; Ruiz-Gutiérrez, V.; De La Torre, R.; Kafatos, A.; Lamuela-Raventós, R.M.; Osada, J.; Owen, R.W.; Visioli, F. Minor components of olive oil: evidence to date of health benefits in humans. *Nutr. Rev.* **2006**, *64*, S20-S30.
12. Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gómez-Caravaca, A.M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Lercker, G. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* **2007**, *12*, 1679-1719.
13. Fabiani, R.; Fuccelli, R.; Pieravanti, F.; De Bartolomeo, A.; Morozzi, G. Production of hydrogen peroxide is responsible for the induction of apoptosis by hydroxytyrosol on HL60 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 887-896.
14. Hrenn A.; Steinbrecher T.; Labahn A.; Schwager J.; Schemp C.M.; Merfort I. Plant phenolics inhibit neutrophil elastase, *Planta Med.*, **2006**, *72*, 1127-1131.
15. Mateos, R.; Domínguez, M. M.; Espartero, J. L.; Cert, A. Antioxidant effect of phenolic compounds,  $\alpha$ -tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7170-7175.
16. Giovannini, C.; Straface, E.; Modesti, D.; Coni, E.; Cantafora, A.; De Vincenzi, M. Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized LDL-induced injury in Caco2 cells. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1269-1277.
17. Di Benedetto, R.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Filesi, C.; Santangelo, C.; Giovannini, C.; Matarrese, P.; D'Archivio, M.; Masella, R. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2007**, *17*, 535-545.

18. Miró-Casas, E., Covas, M. I., Farré, M., Fito, M., Ortuño, J., Weinbrenner, T., et al. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clinic. Chem.* **2003**, *49*, 945-952.
19. Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Galli, G., and Caruso, D. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 159-160.
20. Vissers, M. H., Zock, P. L., Roodenburg, A. J., Leenen, R., & Katan, M. B. Olive oil phenols are absorbed in humans. *Jour.Nut*, **2002**, *132*, 409-417.
21. Caruso, D., Visioli, F., Patelli, R., Galli, C., & Galli, G. Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans. *Metab.Clinic. &Exp*, **2001**, *50*, 1426-1428.
22. Larrosa, M., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A. Antioxidant capacity of tomato juice functionalised with enzymatically synthesised hydroxytyrosol. *J.Sci.Food Agric.*, **2003**, *83*, 658-666.
23. Siebrecht, P. Food products containing an olive extract. Ger, **2008**. WO2007EP08673 20071005.
24. Cofrades, S.; Salcedo Sandoval, L.; Delgado-Pando, G.; López-López, I.; Ruiz-Capillas, C.; Jiménez-Colmenero, F. Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chem.* **2011**, *129*, 429-436.
25. Brenes, M.; García, A.; García, P.; Ríos, J. J.; Garrido, A. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3535-3540.
26. Espartero, J. L.; Mateos, R.; Trujillo, M.; Cert, A.; Alcudia, F. Caracterización estructural de nuevos polifenoles presentes en el aceite de oliva, en *Libro de Resúmenes del XXVII Congreso Bienal de la Real Sociedad Española de Química (RSQC)*, La Laguna, **1999**, 165.
27. Bianco, A.; Coccioli, F.; Guiso, M.; Marra, C. The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans, *Food Chem.* **2001**, *77*, 405-411.
28. Cert, A. et al. *Preparación y estudio de las propiedades funcionales del hidroxitirosol, 3',4'-dihidroxifenilglicol y ésteres de hidroxitirosilo como ingredientes de los alimentos.* **2004**, Proyecto CICYT: AGL2004-07935-C03.
29. Cert, A. y col. *Preparación y evaluación de éteres de hidroxitirosilo como componentes funcionales de alimentos.* **2007**, Proyecto CICYT: AGL2007-66373-C04.
30. Espartero, J.L. y col. Aprovechamiento de Subproductos de la Industria Olivarera. Síntesis y Evaluación de Nuevos Antioxidantes con Potencial Aplicación en el Tratamiento del Parkinson. **2010**. Proyecto de Excelencia Junta de Andalucía: P09-AGR-5098.
31. Trujillo, M.; Mateos, R.; Collantes, L.; Espartero, J. L.; Cert, R.; Jover, M.; Alcudia, F.; Bautista, J.; Cert, A.; Parrado, J. Lipophilic hydroxytyrosyl esters. Antioxidant activity in lipid matrices and biological systems. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3779-3785.
32. Mateos, R.; Trujillo, M.; Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Cert, A.; Espartero, J.L. New lipophilic tyrosyl esters. Comparative antioxidant evaluation with hydroxytyrosyl esters. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10960-10966.
33. Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Mateos, R.; Rodríguez, G.; Trujillo, M.; Fernández-Bolaños, J.; Espartero, J.L. Synthesis of hydroxytyrosyl alkyl ethers from olive oil waste waters. *Molecules* **2009**, *14*, 1762-1772.
34. Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Bravo, L.; Espartero, J.L.; Alcudia, A.; Cert, A.; Mateos, R. Antioxidant activity evaluation of alkyl hydroxytyrosyl ethers, a new class of hydroxytyrosol derivatives. *Food Chem.* **2009**, *115*, 86-91.
35. Mateos, R.; Trujillo, M.; Perez-Camino, M. C.; Moreda, W.; Cert, A. Relationships between oxidative stability, triacylglycerol composition, and antioxidant content in olive oil matrices. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5766-5771.
36. González-Correa, J.A.; Navas, M.D.; López-Villodres, J.A.; Trujillo, M.; Espartero, J.L.; De La Cruz, J.P. Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Neurosc. Lett.* **2008**, *446*, 143-146.
37. González-Correa, J.A.; Navas, M.D.; Muñoz-Marín, J.; Trujillo, M.; Fernández-Bolaños, J.; De La Cruz, J.P. Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7872-7876.
38. González-Correa, J.A.; López-Villodres, J.A.; Asensi, R.; Espartero, J.L.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; De La Cruz, J.P. Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet

- aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid. *Brit. Jour of Nut.* **2009**, *101*, 1157-1164.
39. Rodríguez, G.; Lama, A.; Trujillo, M.; Espartero, J.L.; Fernández-Bolaños, J. Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol. *LWT - Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 483-490.
  40. Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Bravo, L.; Mateos, R.; Espartero, J.L. Preparation and antioxidant activity of tyrosyl and homovanillyl ethers. *Food Chem.* **2010**, *129*, 1169-1178.
  41. Pereira-Caro, G.; Mateos, R.; Saha, S.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Bravo, L.; Kroon, P. Transepithelial transport and metabolism of new lipophilic ether derivatives of hydroxytyrosyl by Enterocyte-like Caco-2/TC7 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (21), 11501-11509.
  42. Pereira-Caro, G.; Bravo, L.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Mateos, R. Uptake and metabolism of new synthetic lipophilic derivatives, hydroxytyrosyl ethers, by human hepatoma Hepg2 Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 798-806.
  43. Espartero, J. L.; Mateos, R.; Trujillo, M.; Cert, A.; Alcudia, F. Caracterización estructural de nuevos polifenoles presentes en el aceite de oliva, en *Libro de Resúmenes del XXVII Congreso Bienal de la Real Sociedad Española de Química (RSQC)*, La Laguna, **1999**, 165.
  44. Espartero, J. L.; Mateos, R.; Trujillo, M.; Alcudia, F.; Cert, A. Hidrólisis enzimática de oleuropeína. Estudio cinético y estructural, en *Libro de Resúmenes de la 1ª Reunión Bienal del Grupo Especializado de RMN de la R.S.E.Q.*, Calella (Barcelona), **2002**, C-36.
  45. Espartero, J. L.; Cert, R.; Domínguez, V.; Jover, M.; Trujillo, M.; Mateos, R.; Collantes, L.; Alcudia, F.; Bautista, J.; Cert, A.; Parrado, J. Isocromanos derivados de hidroxitirosol. Actividad antioxidante en matrices lipídicas y sistemas biológicos, en *1er Congreso Hispano-Marroquí de Química Orgánica*, Marrakech (Marruecos), **2004**, A-154.
  46. Trujillo, M.; Mateos, R.; Collantes L.; Espartero, J. L.; Cert, R.; Jover, M.; Alcudia, F.; Bautista, J. D.; Parrado, J.; Cert, A. Esteres de hidroxitirosol. Actividad antioxidante en matrices lipídicas y sistemas biológicos, en *1er Congreso Hispano-Marroquí de Química Orgánica*, Marrakech (Marruecos), **2004**, A-158.
  47. Pérez-Camino, M. C.; Rodríguez-Acuña, R.; Cert, A.; Cert, R.; Espartero, J. L.; Trujillo, M.; Alcudia, F. Interaction between antioxidant capacities of  $\alpha$ -tocopherol and hydroxytyrosyl acetate, minor components of virgen olive oil, en *1er Congreso Hispano-Marroquí de Química Orgánica*, Marrakech (Marruecos), **2004**, A-153.
  48. Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Mateos, R.; Espartero, J.L.; Trujillo, M.; Bravo, L.; Alcudia, F.; Pérez-Camino, M.C.; Cert, A. Preparation and antioxidant activity evaluation of hydroxytyrosyl ethers, a new class of hidroxitirosol derivatives, en *5th Euro Fed Lipid congress*, Goteborg (Suecia), **2007**, Oxi-018, 303.
  49. Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Espartero, J.L.; Mateos, R.; Rodríguez, G.; Trujillo, M.; Bravo, L.; Pérez-Camino, M.C.; Fernández-Bolaños, J.; Alcudia, F.; Cert, A. Síntesis y evaluación de la actividad antioxidante de éteres de hidroxitirosilo, en *Libro de resúmenes de la XXXI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química (RSEQ)*, Toledo, **2007**, 270.
  50. Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Mateos, R.; Espartero, J.L.; Trujillo, M.; Alcudia, F.; Cert, A. Tyrosyl esters. Synthesis and antioxidant activity, en *6th Euro Fed Lipid Congress*, Atenas (Grecia), **2008**, Oxi-031, 459.
  51. Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Trujillo, M.; Bravo, L.; Alcudia, F.; Cert, A.; Espartero, J.L. Synthesis and antioxidant activity of tyrosyl and homovanillyl ethers, en *3er Congreso Hispano-Marroquí de Química Orgánica*, Tetuán (Marruecos), **2009**, PO-12, 116.
  52. Espartero, J.L.; Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Mateos, R.; Trujillo, M.; Bravo, L.; Alcudia, F.; Cert, A. Preparation and antioxidant activity of tyrosyl and homovanillyl ethers. Comparison with hydroxytyrosyl derivatives as functional ingredients, en *EuroFood Chem XV*, Copenhague (Dinamarca), **2009**, Ab79, 180.
  53. Reyes de la Vega, J. J.; Ruiz M. I.; Jebrouni, N.; Madrona, A.; De la Cruz J.P.: Antiplatelet Effect of Four Hydroxytyrosyl Ethers in Whole Human Blood. *European Journal of Clinical Pharmacology*. Congress of the Spanish Society of Pharmacology, **2010**. Leon, Spain. (32). Num. 32.
  54. Guerrero, A. M.; López J.A.; Muñoz J.; Espartero J.L.; Gonzalez-Correa J.A. Neuroprotective Effect of Hydroxytyrosol Alkyl Ethers in Rat Brain Slices. *European Journal of Clinical*

- Pharmacology. Congress of the Spanish Society of Pharmacology, **2010**. Leon, Spain. (32). Num. 32.
55. Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Bravo, L.; Gallardo, E.; Espartero, J.L.; Mateos, R. Evaluación de la Actividad Antioxidante de Isocromanos derivados de Hidroxitirosol. *XV Simposio científico-técnico del aceite de oliva, EXPOLIVA*. Jaén. **2011**. ISBN. 978-84-938900-0-1.
56. Pereira-Caro, G.; Sarriá, B.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Goya, L.; Bravo, L.; Mateos, R. Los éteres de hidroxitirosilo muestran efecto protector frente al estrés oxidativo en células de hepatoma humano (HepG2). *XV Simposio científico-técnico del aceite de oliva, EXPOLIVA*. Jaén. **2011**. ISBN. 978-84-938900-0-1.
57. Alcudia, F.; Cert, A.; Espartero, J. L.; Mateos, R.; Trujillo, M. Process for the preparation of hydroxytyrosol esters for use as additives in food, cosmetics and pharmaceutical compositions. *PCT Int. Appl.*, **2004**, 32 pp., *WO 2004005237*.
58. Cert, A.; Romero, A.; Trujillo, M.; Mateos, R.; Alcudia, F.; Espartero, J.L. Procedimiento de Obtención de Aceites y Grasas con Alto Contenido Antioxidante. **2010**, P201031431.
59. Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J.A. Main methods used in lipid oxidation determination, *Food Sci. Tech. Int.* **1998**, 4, 391-399.
60. Halliwell, B. Antioxidants and human disease: a general introduction, *Nutrition Rev.* **1997**, 55, S44-S52.
61. Okezie, I.A. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, 74, 199-212.
62. Halliwell, B. Oxidative stress, nutrition and health, *Free Rad. Res.* **1996**, 25, 57-74.
63. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Pág. 319.
64. Wong, D.W.S. "Lípidos" en *Química de los alimentos: Mecanismos y teoría*; Ed Acribia, Zaragoza, **1989**, 1-52.
65. Frankel, E.N. Natural antioxidants in foods and biological systems. Their mechanism of action, application and implication, *Lipid Technol.* **1995**, 7, 77-80.
66. Halliwell, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 49, 1341-1348.
67. Tomás-Barberán, F.A. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud.* **2002**, 52, 7170-7175.
68. Real Decreto 142/2002, BOE nº 44/2002 de 20/2/2002.
69. Castera-Rossignol, a.; Bosque, F. Nouvelle approche des anti-oxydants, *Oleagineux Corps Gras Lipides.* **1994**, 1, 131-134.
70. Sun, B.; Fukuhara, M. Effects of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drug-metabolizing enzymes in mice, *Toxicology.* **1997**, 122, 61-72.
71. Nohl, H.; Stolze, K.; The effects of xenobiotics on erythrocytes, *Gen. Pharmacol.* **1998**, 31, 343-347.
72. Sarafian, T. A.; Kouyoumijan, S.; Tashkin, D.; Roth, M.D. Synergistic toxicity of D<sub>9</sub>-tetrahydrocannabinol and butylated hydroxyanisole, *Toxicol. Lett.* **2002**, 133, 171-179.
73. Nakagawa, Y.; Propyl gallate-induced DNA fragmentation in isolated rat hepatocytes, *Arch. Toxicol.* **1997**, 72, 33-37.
74. Evans, R. J. "Optimizing lipid stability with natural antioxidants", en: Natural antioxidants, chemistry, health effects and applications, Ed. Shaidi, F., *AOCS Press*, Champaign, **1997**, 224-244.
75. Moure, A.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Domínguez, J. M.; Sineiro, J.; Domínguez, H.; Núñez, M. J.; Parajó, J. C. Natural antioxidants from residual sources, *Food Chem.* **2001**, 72, 145-171.
76. Harborne, J.B. *General procedures and measurements of total phenolics* in "plant phenolics", from "Methods in plant biochemistry series"; Dey P.M. & Harborne J.B. (Eds.), Vol. 1, Academic Press, Londres, **1989**.
77. Panizzi, L.; Searpati, M. L.; Oriente, G. The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of the olive with hypotensive action. II, *Gazz. Chim. Ital.* **1960**, 90, 1449-85.
78. Amiot, M.T.; Fleuriet, A.; Macheix, J.T.; Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation, *J. Agric. Food Chem.* **1986**, 34, 823-826.

79. Angerosa, F.; D'Alessandro, N.; Corona, F.; Mellerio, G. Characterización of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1996**, *736*, 195-203.
80. Cantarelli, C. Polyphenols in the fruit and in olive oil, *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **1961**, *38*, 69-72.
81. Montedoro, G.; Cantarelli, C. Investigations on the phenolic substances present in olive oils, *Riv. Ital. Sostanze Grasse*. **1969**, *46*, 115-124.
82. Solinas, M.; Di Giovacchino, L.; Mascolo, A. The polyphenols of olives and olive oil. Note III: influence of temperature and kneading time on the oil polyphenol content, *Riv. Ital. Sostanze Grasse*. **1978**, *55*, 19-23.
83. Montedoro, G.F.; Garofolo, L. The qualitative characteristics of virgin olive oils. The influence of variables such as variety, environment, preservation, extraction, conditioning of the finished product, *Riv. Ital. Sostanze Grasse*. **1984**, *61*, 157-168.
84. Solinas, M. HRGC analysis of phenolic components in virgin olive oils in relation to the ripening and the variety of olives, *Riv. Ital. Sostanze Grasse*. **1987**, *64*, 255-262.
85. Di Giovacchino, L.; Solinas, M.; Miccoli, M. Effect of extraction systems on the quality of virgin olive oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1994**, *71*, 1189-1194.
86. Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Miniati, E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and semiquantitative evaluation by HPLC, *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1571-1576.
87. Paredes, C.; Cegarra, J.; Roig, A.; Sánchez-Monedero, M.A.; Bernal, M.P. Characterization of olive mill wastewater (alpechín) and its sludge for agricultural purposes, *Bioresource Technol.* **1999**, *67*, 111-115.
88. Fernández-Bolaños J.; Heredia A.; Rodríguez G.; Rodríguez R.; Jiménez A.; Guillén R. Methods for obtaining purified hydroxytyrosol from products and by-products derived from the olive tree. **2005**, *US 6,849,770 B2*.
89. Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**, *58*, 966-968.
90. Tsimidou, M.; Papadopoulos, G.; Boskou, D. Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by RP-HPLC with emphasis on UV detection, *Food Chem.* **1992**, *44*, 53-60.
91. Vázquez, A.; Janer, C.; Janer, M.L. Polifenoles naturales y estabilidad del aceite de oliva, *Grasas y Aceites*. **1975**, *26*, 14-18.
92. Gutiérrez, R.; Janer, C.; Janer, M.L.; Gutiérrez, F. Relación entre los polifenoles y la calidad y estabilidad del aceite de oliva virgen, *Grasas y Aceites*. **1977**, *28*, 101-106.
93. Cert, A.; Alba, J.; León-Camacho, M.; Moreda, W.; Pérez-Camino, M.C. Effects of talc addition and operating mode on the quality and oxidative stability of virgin olive oils obtained by centrifugation, *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3930-3934.
94. Baldioli, M.; Servili, M.; Perretti, G.; Montedoro, G.F. Antioxidant activity of tocopherol and phenolic compounds of virgin olive oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 1589-1593.
95. Gordon, M.H.; Paiva-Martins, F.; Almeida, M., Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2480-2485.
96. Papadopoulos, G.; Boskou, D. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**, *68*, 669-671.
97. Chimi, H.; Sadik, A.; Le Tutour, B.; Rahmani, M. Contribution a l'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol, de l'hydroxytyrosol, de l'acide caféique, de l'oleuropéine et du BHT, *Rev. Franc. Corps Gras* **1998**, *35*, 339-344.
98. Mateos, R. *Caracterización de componentes fenólicos del aceite de oliva y su relación con la estabilidad oxidativa y el amargor*, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, **2002**.
99. Scott, G. **1965**. "Atmospheric oxidation and antioxidants". Ed Elsevier, London and New York.
100. Visioli, F., Galli, C. **1998**. "Olive oil phenols and their potential effects on human health". *J. Agric. Food Chem.* *46*, 4292-4296.
101. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. **1996**. "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids". *Free Radical Biology and Medicine*. *20*, 933-956.

102. Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. **1997**. "Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships". *Free Radical Biology and Medicine*. **22**, 749-760.
103. Owen, R.W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Hauber, R.; Würtele, G.; Gelhalder, B.; Bartsch, H. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants, *Lancet Oncology* **2000**, *1*, 107-112.
104. Castro, P.; Miranda, J.L.; Gomez, P.; Escalante, D.M.; Segura, F.L.; Martín, A.; Fuentes, F.; Blanco, A.; Ordovas, J.M.; Jiménez, F.P. Comparison of an oleic acid enriched-diet vs NCEP-I diet on LDL susceptibility to oxidative modifications, *Eur. J. Clin. Nutr.* **2000**, *54*, 61-67.
105. Fito, M.; Covas, M.I.; Lamuela-Raventos, R.M.; Vila, J.; de la Torre, C.; Marrugat, A. Olive oil and inhibition of low density lipoprotein oxidation. Role of phenolic compounds, *Med. Clin.* **2000**, *115*, 166-169.
106. Patrick, L.; Uzick, M. Cardiovascular disease: C-reactive protein and the inflammatory disease paradigm: HMG-CoA reductase inhibitors, alpha-tocopherol, red yeast rice, and olive oil polyphenols. A review of the literature, *Altern. Med. Rev.* **2001**, *6*, 248-271.
107. Visioli, F.; Galli, C.; Galli, G.; Caruso, D. Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104*, 677-684.
108. Leenen, R.; Roodenburg, A.; Vissers, M.; Schuurbijs, J.; van Putte, K.; Wiseman, S.; van de Put, F. Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: Influence on LDL oxidation, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1290-1297.
109. Chimi, H.; Morel, I.; Lescoat, G.; Padeloup, N.; Cillard, P.; Cillard, J. Inhibition of iron toxicity in rat hepatocyte culture by natural phenolic compounds, *Toxicol. in vitro* **1995**, *9*, 695-702.
110. Deiana, M.; Aruoma, O.I.; Bianchi, M.L.; Spencer, J.P.; Kaur, H.; Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Banni, S.; Dessi, M.A.; Corongiu, F.P. Inhibition of peroxynitrite dependent DNA based modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol, *Free Radical. Biol. & Medicine* **1999**, *26*, 762-769.
111. Quiles, J.L.; Farquharson, A.J.; Simpson, D.K.; Grant, I.; Wahle, K. W. J. Olive oil phenolics: Effect on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells, *Brit. J. Nutrition* **2002**, *88*, 225-234.
112. Manna, C.; Galletti, P.; Cucciolla, V.; Montedoro, O.; Leone, A.; Zappia, V. The protective effect of the olive oil polyphenol (3',4'-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells, *J. Nutrition* **1997**, *127*, 286-292.
113. Manna, C.; Galletti, P.; Cucciolla, V.; Montedoro, G.; Zappia, V. Olive oil hydroxytyrosol protect human erythrocytes against oxidative damages, *J. Nutritional Biochem.* **1999**, *10*, 159-165.
114. Saija, A.; Trombetta, D.; Tomaino, A.; Lo Cascio, R.; Princi, P.; Uccella, N.; Bonina, F.; Castelli, F. "In vitro" evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol, *Int. J. Pharmaceutics* **1998**, *166*, 123-133.
115. Ruiz, V.; de la Puerta, R.; Catalá, A. The effect of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein on the non-enzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes, *Molecular Cellular Biochem.* **2001**, *212*, 35-41.
116. Reitjens, S.J.; Bast, A.; de Vente, J.; Haenen, G.R. The olive oil antioxidant hydroxytyrosol efficiently protects against the oxidative stress-induced impairment of the NO response of isolated rat aorta, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2007**, *292*, H1931-H1936.
117. Goya, L.; Mateos, R.; Bravo, L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells, *Eur. J. Nutr.*, **2007**, *46*, 70-78.
118. Carluccio, M.A.; Siculella, L.; Ancora, M.A.; Massaro, M.; Scoditti, E.; Storelli, C.; Visioli, F.; Distanti, A.; De Caterina, R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation, *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology* **2003**, *23*, 622-629.
119. Stupans, I.; Strech, G.; Hayball, P. Olive oil phenols inhibit human hepatic microsomal activity, *J. Nutrition* **2000**, *130*, 2367-2370.
120. De la Puerta, R.; Ruiz, V.; Hault, J.R. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil, *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 445-449.
121. Driss, F.; Duranthon, V.; Virad, V. Biological effects of olive polyphenolic compounds, *Oleagineux Corps Gras Lip.* **1996**, *3*, 448-451.

122. Della Ragione, F.; Cucciolla, V.; Borriello, A.; Della Pietra, V.; Pontoni, G.; Racioppi, L.; Manna, C.; Galletti, P.; Zappia, V. Hydroxytyrosol, and natural molecule occurring in olive oil induces cytochrome C-dependent apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2000**, *278*, 733-739.
123. Fabiani, R.; De Bartolomeo, A.; Rosignoli, P.; Servili, M.; Montedoro, G.F.; Morozzi G. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis, *Eur. J. Cancer Prevention* **2002**, *11*, 351-358.
124. Lee-Huang, S.; Huang, P.L.; Zhang, D.; Lee, J.W.; Bao, J.; Sun, Y.; Chang, Y.T.; Zhang, J.; Huang, P.H. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropeína and hydroxytyrosol: Part I. Integrase inhibition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2007**, *354*, 872-878.
125. Tuck, K.L.; Freeman, M.P.; Hayball, P.J.; Stretch, G.L.; Stupans, I. The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats, *J. Nutrition* **2001**, *131*, 1993-1996.
126. Miró-Casas, E.; Covas, M.I.; Farre, M.; Fito, M.; Ortuno, J.; Weinbrenner, T.; Roset, P.; de la Torre, R. Hydroxytyrosol disposition in humans, *Clinical Chem.* **2003**, *49*, 945-951.
127. Visioli, F.; Galli, C.; Bornet, F.; Mattei, A.; Patelli, R.; Galli, G.; Caruso, D. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans, *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 159-160.
128. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), "anti-inflammatory properties" (ID 1882), "contributes to the upper respiratory tract health" (ID 3468), "can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract" (3779), and "contributes to body defences against external agents" (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, **2011**, *9* (4), 2033.
129. Gutiérrez-Rosales, F.; Ríos, J.J.; Gómez-Rey, M.L. Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6021-6025.
130. Mateos, R.; Cert, A.; Pérez-Camino, M. C.; García, J. M. Evaluation of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2004**, *81*, 71-75.
131. Beauchamp, G. K., Keast, R. S. J., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C. H., Smith, A. B., & Breslin, P. A. S. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, **2005**, *437*, 45-46.
132. Manna, C., Napoli, D., Cacciapuoti, G., Porcelli, M., & Zappia, V. Olive oil phenolic compounds inhibit homocysteine-induced endothelial cell adhesion regardless of their different antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3478-3482.
133. Mukherjee, S; Lekli, I, Gurusamy, N, Bertelli, A.A, Das, D.K. Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *Free Radic Biol Med.* **2009**, *46*, 573-578.
134. Briante, R.; Patumi, M.; Febbraio, F.; Nucci, R. Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase. *Journal of Biotechnology*, **2004**, *111*, 67.
135. Tabera, J.; Guinda, A.; Ruiz-Rodríguez, A.; Señoráns, F.J.; Ibáñez, E.; Albi, T.; Reglero, J. Countercurrent Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of High-Added-Value Compounds from a Hexane Extract of Olive Leaves. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4774.
136. Brenes-Balbuena, M.; de Castro Gómez-Millán, A. Production of Antioxidant substances (hydroxytyrosol and elenolic acid glucoside) from process solutions in the manufacture of olives. *ES 2*, *186*, 467, **2003**; *SciFinder Scholar*. AN 2004:690748.
137. Bianco, A.; Passacantili, P.; Righi, G. *Synthetic Communications* **1988**, *18*, 1765.
138. Espín, J.C.; Soler-Rivas, C.; Cantos, E.; Tomás-Barbarán, F.A.; Wichers, H.J. *J. Agric. Food Chem* **2001**, *49*, 1187.
139. Allouche, N.; Sayadi, S. *J. Agric. Food Chem* **2005**, *53*, 6525.
140. Bovicelli, P.; Antonioletti, R.; Mancini, S.; Causio, S.; Borioni, G.; Ammendola, S.; Barontini, M. Expedient synthesis of hydroxytyrosol and its esters. *Synthetic Communications.* **2007**, *37*, 4245-4252.



141. Barontini, M.; Bernini, R.; Crisante, F.; Mincione, E. Process for preparation of hydroxytyrosol derivatives and hydroxytyrosol by oxidative demethylation. IT 2007MI1110 A1 20070831. **2007**.
142. Alvarez De Manzaneda, E.; Chahboun, R.; Haidoour B. Method for the preparation of hydroxytyrosol and 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanol from methylenedioxybenzenes. WO 2009153374. **2009**.
143. Grasso, S.; Siracusa, L.; Spataforma, C.; Renis, M.; Tringali, C. Hydroxytyrosol lipophilic analogues: Enzymatic synthesis, radical scavenging activity and DNA oxidative damage protection, *Bioorg. Chem.* **2007**, *35*, 137-152.
144. Guiso, M.; Marra, C.; Cavarischia, C. Isochromans from 2-(3',4'-dihydroxy) phenylethanol, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6531-6534.
145. Lorenz, P.; Zeh, M.; Martens, J.; Schmidt, H.; Wolf, G.; Horn, T.F.W. Natural and newly synthesized hydroxy-1-aryl-isochromans: A class of potential antioxidants and radical scavengers, *Free Rad. Res.* **2005**, *39*, 535-545.
146. Domínguez Leñero, Vanessa, *Isocromanos derivados de hidroxitirosol. Síntesis y evaluación de la actividad antioxidante en matrices lipídicas y sistemas biológicos*, Memoria DEA, Universidad de Sevilla, **2006**.
147. Lorenz, P. Use of 1-arylisochroman derivatives as cell proliferation inhibitors for the treatment of cancer, Ger., **2006**, 17 pp., DE 102006005221.
148. Torres de Pinedo, A. Synthesis and evaluation of new phenolic fatty acid esters and their evaluation as lipophilic antioxidants in an oil matrix. *Food Chem.* **2007b**, *105*, 657-665.121.
149. Bernini, R.; Crisante, F.; Merendino, N.; Molinari, R.; Soldatelli, M.C.; Velotti, F. Synthesis of a novel ester of hydroxytyrosol and  $\alpha$ -lipoic acid exhibiting an antiproliferative effect on human colon cancer HT-29 cells. *Eur. Jour. of Med. Chem.* **2011**, *46*, 439-446.
150. Imai, K.; Inagaki, M.; Saitoh, Y.; Yura, A.; Sakagami, H.; Suzuki, M.; Oguchi, K. Radical scavenging activity and cytotoxicity of phenethyl ether and cinnamic amide derivatives, *Anticancer Res.*, **2002**, *22*, 1661-1666.
151. Hasegawa, Y.; Shinto, S.; Hattori, T.; Ohata, T.; Aga, A.; Bae, H.R.; Yang, K. Substituted catechol derivatives and therapeutics containing them for nephritis, Jpn. Kokai Tokkyo Koho, **1998**, 13 pp., JP 10273464
152. Chimi, H. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Jour. Of Am. Oil Chem.* **1991**, *68*, 307-312.
153. Benavente-García, O. Antioxidant activity of phenolics extractes from *Olea europea* L. leaves. *Food Chem.* **2000**, *68*, 457-462.
154. Artajo L.S. Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds. *Jour. Agric. Food. Chem.* **2006**, *54*, 6079-6088.
155. Ranlli, A. Antioxidizing potency of phenol compounds in olive oil mill wastewaters. *Jour. Agric. Food. Chem.* **2003**, *51*, 7636-7641.
156. Torres de Pinedo, A. Synthesis and evaluation of new phenolic fatty acid esters and their evaluation as lipophilic antioxidants in an oil matrix. *Food Chem.* **2007a**, *103*, 55-61.
157. Son, S., Lewis, B.A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *Jour. Agric. Food. Chem.* **2002**, *50*, 468-472.
158. Moon, J.H., Terao, J. Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. *Jour. Agric. Food. Chem.* **1998**, *46*, 5062-5065.
159. Chen, C.P. Inhibitory effect of caffeic acid analogues isolated from *Salviae miltiorrhizae* radix against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Exp. Toxicol. Pathol.* **1999**, *51*, 59-63.
160. Silva, F.A. Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physicochemical parameters. *Jour. Agric. Food. Chem.* **2000**, *48*, 2122-2126.
161. Nenadis, N. Structure-antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: effect of carbon side chain characteristic groups. *Jour. Agric. Food. Chem.* **2003b**, *51*, 1874-1879.
162. Frankel, E.N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in foods lipids, *Trends Food Sci. Technol.*, **1993**, *4*, 220-225.

163. Berset, C.; Cuvelier, M.E. Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidant power, *Sci. Aliments* **1996**, *16*, 29-245.
164. Villaño, D. *Comparación de diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante del vino y su relación con la composición fenólica*, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, **2005**.
165. Porter, W.L.; Black, E.D.; Drolet, A.M. Use of polyamide oxidative fluorescent test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems, *J. Agric. Food. Chem.*, **1989**, *37*, 615-624.
166. Frankel, E.N.; Huang, S.W.; Kanner, J.; German, J.B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, *42*, 1054-1059.
167. Schwarz, K.; Frankel, E.N.; German, J.B. Partition behaviour of antioxidant phenolic compounds in heterophasic systems, *Fett/Lipid* **1996**, *98*, 115-121.
168. Pryor, W.A.; Cornicelli, J.A.; Devall, L.J.; Tait, B.; Trivedi, B.K.; Witiak, D.T.; Wu, M. A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3521-3532.
169. Shahidi, F.; Zhong, Y. Revisiting the Polar Paradox Theory: A Critical Overview. *J. Agric. Food Chem* **2011**, *59*, 3499-3504.
170. Huang, D.; Ou, B.; Prior, L. The chemistry behind antioxidant capacity assays, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841-1856.
171. Zhou, B.; Liu, Z.L. Bioantioxidants: from chemistry to biology, *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 1887-1903.
172. Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290-4302.
173. Roginsky, V.; Lissi, E.A. Review of methods to determine Chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chem.* **2005**, *92*, 235-254.
174. Antolovich, M.; Prenzel, P.D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. Methods for testing antioxidant activity, *Analyst*, **2002**, *127*, 183-198.
175. Sánchez-Moreno, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Sci. Tech. Int.* **2002**, *8*, 121-137.
176. Corona G. et al., The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation, *Free Rad. Res.*, **2006**, *40*, 647-658.
177. Miller, N.J.; Rice-Evans, C.A.; Davies, M.J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science.* **1993**, *84*, 407-712.
178. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology.* **1994**, *234*, 279-293.
179. Benzie, IFF.; Strain, J.J. The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay, *Anal. Biochem.*, **1996**, *239*, 70-76.
180. Benzie, IFF.; Strain, J.J. Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, *Methods Enzymol.*, **1999**, *299*, 15-27.
181. Arnous, A.; Makris, D.P.; Kefalas, P. Effect of principle polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 5736-5742.
182. Re R.; Pellegrini, N.; Proteffente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Biol. Med.*, **1999**, *26*, 1231-1237.
183. Brand-Williams, w.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology.* **1995**, *28*, 25-30.
184. Scheller S.; Wilczok T.; Imielski S.; Krol W.; Gabrys J.; Shani J. Free radical scavenging by ethanol extract of propolis, *Int. J. Radiation Biol.*, **1990**, *57*, 461-465.
185. Yu L. Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 3452-3456.

186. Amao M.B.; Cano A.; Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chem.*, **2001**, *73*, 239-244.
187. Serafini, M.; Bugianesi, R.; Maiani, G.; Valtuena, S.; De Santis, S.; Crozier, A. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature*. **2003**, *424*, 1013.
188. Wayner, D.D.M.; Burton, G.W.; Ingold, K.U.; Locke, S. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: the important contribution made plasma proteins. *FEBS Letter*. **1985**, *187*, 33-37.
189. Prior R.L.; Cao, G.H. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review, *J. Am. Oil Anal. Chem. Int.*, **2000**, *83*, 950-956.
190. Cao, G.; Prior, R.L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum, *Clin. Chem.*, **1998**, *44*, 1309-1315.
191. Ou, B.; Hampsch, M.; Prior F.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 4619-4626.
192. Huang, D.; Ou, B.; Hampsch, M.; Flanagan, J.A.; Prior, R.L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 4437-4444.
193. Laguerre, M.; López Giraldo, L.J.; Lecomte, J.; Figueroa-Espinoza, M.C.; Baréa, B.; Weiss, J.; Decker, E.A.; Villeneuve, P. Chain length affects antioxidant properties of chlorogenate esters in emulsion: the cut-off theory behind the polar paradox. *Jour of Agric and Food Chem*. **2009**, *57*, 11335-11342.
194. American Oil Chemist's Society (AOCS). Método Cd 12b-92. Oil Stability Index. *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society*, 5<sup>th</sup> Ed. AOCS, Champaign, **1998**.
195. Hamada, A.; Yaden, E.L.; Horng, J. S.; Ruffolo, R.R., Jr.; Patil, P.N.; Miller, D.D. N-Substituted imidazolines and ethylenediamines and their action on  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors. *J. Med. Chem.*, **1985**, *28*, 1269-73.
196. Ajao, J.F., Bird, C.W., Chauhan, Y.P. The evaluation of a biogenetically based approach to the synthesis of octahydro-1h-benzofuro[3,2-e]isoquinolines. *Tetraedron Letters*, **1985**, *41*, 1367-1372.
197. Battersby, A. R., Le Count, D. J., Garratt, S., & Thrift R. I. Synthetic applications of 1,2-dihydroisoquinolines : Synthesis of ( $\pm$ )-coreximine. *Tetraedron*, **1961**, *14*, 46-53.
198. Shahane, S.; Louafi, F.; Moreau, J.; Hurvois, J.P. Synthesis of Alkaloids of *Galipea officinalis* by Alkylation of an  $\alpha$ -Amino Nitrile. *Eur. Jour. Org. Chem*. **2008**, 4622-4631.
199. Maruyama, K.; Kobayashi, F.; Osuka, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 2672-2681.
200. Capasso, R.; Evidente, A.; Avolio, S.; Solla, F. A highly convenient synthesis of hydroxytyrosol and its recovery from agricultural waste waters. *J. Agric. Food Chem*, **1999**, *47*, 1745-1748.
201. Yokotani, J.; Takatori, A.; Tada, Y.; Yanai, M.; Kato, H.; Taniguchi, Y.; Tanabe, C. Preparation of N-acylanthranilic acid derivatives or salts thereof as collagen production inhibitors. *WO 2010087430 A1 20100805*. **2010**.
202. Syper, L. The Baeyer-Villiger oxidation of aromatic aldehydes and ketones with hydrogen peroxide catalyzed by selenium compounds. A convenient method for the preparation of phenols. *Synthesis*, **1989**, 167.
203. Yoshida, H.; Kondo, I.; Kajimoto, G. Participation of free fatty acids in the oxidation of purified soybean oil during microwave heating, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 1136-1140.
204. Consejo Oleícola Internacional (COI), *Preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos*, COI/T.20/Doc. N° 24, Método A, **2001a**.
205. Internacional Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Método 2.432 para la determinación de tocoferoles en aceites vegetales por cromatografía líquida de alta eficacia, *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*, 1<sup>st</sup> supplement to 7<sup>th</sup> Ed., Pergamon, Oxford, **1992**.

206. Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 3396-3402.
207. Cesquini, M.; Torsoni, M.A.; Stoppa, G.R.; Ogo, S.H. t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. **2003**, *57*, 124-129.
208. Ko, F.N.; Hsiao, G.; Kuo, Y.H. Protection of oxidative hemolysis by dimethyldiisoeugenol in normal and  $\beta$ -thalasemic red blood cells. *Free Radical Biology and Medicine*. **1997**, *22*, 215-222.
209. Pokorny, J. Major factors affecting the antioxidant of lipids. In: Chan, H.W.S, ed. Autoxidation of unsaturated lipids. London, Academic Press, **1987**, 141-206.
210. Gaspar, A.; Martins, M.; Silva, P.; Manuela Garrido, E.; Garrido, J.; Firuzi, O.; Miri, R.; Saao, L.; Borges, F. Dietary phenolic acid and derivatives. Evaluation of the antioxidant activity of sinapic acid and its alkyl esters. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 11273-11280.
211. Laguerre, M.; Lopez-Giraldo, L.J.; Lecomte, J.; Figueroa-Espinoza, M.; Barea, B.; Weiss, J.; Decker, E.; Villeneuve, P. Chain Length Affects Antioxidant Properties of Chlorogenate Esters in Emulsion: The Cutoff Theory Behind the Polar Paradox. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11335-11342.
212. Laguerre, M.; López-Giraldo, L.J.; Lecomte, J.; Figueroa-Espinoza, M.C.; Baré, A.B.; Weis, J.; Decker, E.A.; Villeneuve, P. Relationship between hydrophobicity and antioxidant ability of "phenolipids" in emulsion: a parabolic effect of the chain length of rosmarinic esters. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 2869-2876.
213. Laguerre, M.; Wrutniak-Cabello, C.; Chabi, B.; López-Giraldo, L.J.; Lecomte, J.; Villeneuve, P.; Cabello, G. Does hydrophobicity always enhance antioxidants drugs? A cut-off effect of the chain length of functionalized chlorogenate esters on ROS-overexpressing fibroblasts. *Royal Pharmaceutical Society*. **2011**, *63*, 531-540.
214. Cena, C.; Chegaev, K.; Balbo, S.; Lanzarato, L.; Rolando, B.; Giorgis, ;; Marini, E.; Fruttero, R.; Gasco, A. Novel antioxidant agents deriving from molecular combination of vitamin C and NO-donor moieties. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2008**, *16*, 5199-5206.