

00524
56



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

LA COMPOSICION QUIMICA DEL AJO Y SUS
PROPIEDADES ANTIOXIDANTES.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLÓGICA
P R E S E N T A :
JESSICA GARCIA ALAMILLA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jessica García Alamilla
FECHA: 26 Febrero 2003
FIRMA: [Firma]

Jurado asignado:

- Presidente: Prof. Rogelio Gregorio Pereda Miranda.
- Vocal: Prof. José Pedraza Chaverri.
- Secretario: Prof. María de Lourdes Mayet Cruz.
- 1er. Suplente: Prof. Catalina Machuca Rodríguez.
- 2do. Suplente: Prof. Juan Gabriel Navarrete Vázquez.

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 209 del Edificio B de la Facultad de Química de la UNAM.

Asesor del tema:
Dr. José Pedraza Chaverri.

[Firma]

Sustentante:
Jessica García Alamilla.

[Firma]

B

Esta tesis se realizó en el laboratorio 209 del Departamento de Biología de la Facultad de Química UNAM, bajo la tutoría del Dr. José Pedraza Chaverri.

Los experimentos citados en la presente tesis y que se realizaron en el laboratorio 209, Edificio B, de la Facultad de Química con polvo ajo, con extracto de ajo envejecido, con dialil sulfuro, con dialil disulfuro, con dialil trisulfuro y con S-alil cisteína en ratas normales y con insuficiencia renal aguda inducida por gentamicina se llevaron a cabo gracias a los donativos de DGAPA (IN203757) y CONACYT (34920-M).

DEDICATORIA

A mi mamá "Chuchita" (M^e de Jesús Rodríguez Rangel[†]), nunca te volveré a ver físicamente, pero tu amor, cariño, fortaleza, paciencia, y ejemplo siempre vivirán en mi corazón y estarán presentes en toda mi vida.

A mi abuelita Esperanza Ramírez Crespo[†], que con tu ejemplo de fortaleza y amor por la vida me enseñaste que hay que disfrutar y aprovechar cada momento pese a las circunstancias que se nos presenten para lograrlo.

A mi "Papi" (Don Raúl Alamilla Pérez[†]) no hubo tiempo de despedirnos, pero además de tu cariño, me enseñaste que hasta en los últimos momentos hay que ser fuertes.

A mi "Mamita" Yolanda Alamilla Rodríguez[†], gracias por todo tu cariño, el dolor de tu pérdida es consolado con saber que ya estás bien.

A todos muchas gracias por ser parte de mi vida, los quiero mucho. Dedicado especialmente a ustedes donde quiera que se encuentren.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y una segunda oportunidad, para culminar una etapa importante de mi vida.

A mi Madre y a mi Padre, a los que les debo el privilegio de vivir, gracias por su ejemplo de superación y honestidad, los cuales han contribuido a mi formación personal.

A ti Miguel, por estar conmigo desde hace algún tiempo y formar parte importante de mi vida, gracias por tu amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos: Jennifer, Adriana y Lalo, los quiero mucho.

A mi prima y mejor amiga: Clara, eres la hermana mayor que me hubiera gustado tener, gracias por tu apoyo, cariño y consejos en todo momento, te quiero mucho.

A mi querido tío: Memo, gracias por tu apoyo y por estar conmigo, te quiero mucho.

A mis amigos: Alicia Martínez, Carlos Frontana, René Manjarréz, Alejandro Guerrero, Alejandra Ortega, Miguel Urbina, Elena Morales, Raúl Sánchez y Angélica Coyoy.

A mi amiga: Ivonne, gracias por tu apoyo en los momentos buenos y malos, y por crecer conmigo.

A mis tíos: Luis y Yolanda, Raúl y Esperanza, Angel y Patricia, Sergio e Irma, Eduardo e Irma, Estela, Elizabeth, Rosario y Judith.

A mis primos: Lupita, Juan, Raúl, Luisa, Mónica, Gabby, Horacio y Dianita, Gerardo y Grecia.

*Gracias, al Dr. José Pedraza Chaverrí por el apoyo y guía en la
realización de este trabajo.
A mis compañeros del laboratorio 209: Ana Elena, Rosaura, Omar,
Perla, Diana, Carlos, Irasema y Paty.*

ABREVIATURAS

Alil-SH	Alil mercaptano.
AMS	Alil metil sulfuro.
AMTS	Alil metil trisulfuro.
AV	Ajos en vinagre.
DADS	Dialil disulfuro.
DAS	Dialil sulfuro.
DASO	Dialil sulfóxido.
DASO ₂	Dialil sulfona.
DATS	Dialil trisulfuro.
DATTS	Dialil tetrasulfuro.
EAE	Extracto de ajo envejecido.
ERO	Especie reactiva de oxígeno.
IRA	Insuficiencia renal agua.
IRC	Insuficiencia renal crónica.
LDL	(Low density lipoprotein) Lipoproteínas de baja densidad.
Ox-LDL	Lipoproteínas de baja densidad modificadas oxidativamente.
RL	Radicales libres.
SAC	S-alil cisteína.
SAMC	S-alil mercaptocisteína.
SPC	S-propenil cisteína.

OBJETIVOS GENERALES

- ◊ Realizar una revisión bibliográfica de la composición química de las diferentes formas en que el ajo se ha consumido desde la antigüedad hasta nuestros días.
- ◊ Recopilar los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* que se han realizado con cada uno de los extractos obtenidos a partir de ajo y de los compuestos individuales, sobre sus efectos en el sistema antioxidante.
- ◊ Proponer un proyecto en el que se realice una comparación de la actividad antioxidante *in vitro* de los diferentes compuestos de ajo, de las preparaciones comerciales y extractos de ajo obtenidos en el laboratorio medida por la capacidad para atrapar especies reactivas de oxígeno y para inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Y posteriormente evaluar la capacidad citoprotectora de las preparaciones, extractos y compuestos de ajo en células LLC-PK1 en cultivo incubadas con gentamicina, la cual constituye un modelo de daño renal *in vitro* mediado por estrés oxidativo.

RESUMEN

El ajo (*Allium sativum*) es la planta "cúralo todo" más popular, ya que se ha usado desde hace mucho tiempo, no sólo como condimento, sino también porque se le atribuyen diversos efectos medicinales. Es una de las plantas medicinales más estudiadas y su estudio no sólo no ha decaído sino que muestra un explosivo aumento en los últimos 7 años en donde se han publicado el 52.5% de los 1645 artículos del ajo registrados en el PubMed de 1963 a 2002. Además las ventas de ajo en sus diferentes preparaciones comerciales también van en aumento: en EUA pasaron de 31.3 millones de dólares en 1993 a 61.2 millones de dólares en el año 2000. Los datos anteriores demuestran el gran interés científico y económico de los derivados del ajo y el aumento en su consumo refleja que el hombre está regresando a los productos naturales para el tratamiento de ciertos padecimientos. Sin embargo, en la literatura científica y en las páginas de internet existen polémicas sobre las propiedades medicinales del ajo, freído en gran medida, a que en la mayoría de los estudios no se ha empleado el ajo fresco sino diferentes extractos y presentaciones comerciales, los cuales difieren en composición química como consecuencia de las transformaciones que algunos componentes del ajo sufren durante su procesamiento y almacenamiento. Además, un problema muy importante en los extractos y productos comerciales es que no existe una estandarización en la preparación y en la identificación cuantitativa de sus componentes. Otro problema es que aún no se conoce la biodisponibilidad de la mayoría de los componentes del ajo, ni existen comparaciones de los efectos benéficos de las diferentes preparaciones comerciales y de los extractos de ajo fresco. Es así como, en esta tesis se realizó una revisión bibliográfica sobre las composición química de cada una de las presentaciones en que el ajo es consumido recopilando las evidencias de los posibles mecanismos por lo cuales ejerce su efecto antioxidante y además se plantea un proyecto para estudiar de manera comparativa la capacidad antioxidante *in vitro* de diferentes compuestos, preparaciones comerciales y extractos de ajo. Es así como, la información que se obtendría al realizarlo contribuirá, indudablemente, a la generación y al avance del conocimiento científico, lo que permitirá hacer recomendaciones para el consumo humano en la prevención o el tratamiento de la hipertensión arterial, las enfermedades cardiovasculares, la insuficiencia renal aguda (IRA) y la insuficiencia renal crónica (IRC), las cuales ocupan los primeros lugares de mortalidad en nuestra población y a nivel mundial.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Aspectos generales	1
1.2 Características morfológicas de la planta	1
1.3 Investigación	2
2. ASPECTOS HISTÓRICOS	6
3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AJO Y DE SUS DIFERENTES PREPARACIONES Y EXTRACTOS	12
3.1 Compuestos con selenio	13
3.2 Compuestos con azufre	15
3.3 Variaciones naturales de los compuestos organosulfurados del ajo	18
3.4 Formación enzimática de los tiosulfatos cuando el ajo es cortado y triturado	19
3.5 Estabilidad de los tiosulfatos	21
3.6 Composición del olor del ajo	22
3.7 Compuestos sulfurados en los productos comerciales	25
3.8 Transformación de los tiosulfatos sobre los procesos comerciales	25
3.9 Cambios por períodos largos de tratamiento (envejecimiento)	25
3.10 Composición de los productos comerciales de ajo	30
3.10.1 Productos con polvo de ajo	33
3.10.2 Productos con aceite de ajo	34
3.10.3 Extracto envejecido de dientes de ajo en vinagre	35
3.11 Absorción y metabolismo de los compuestos organosulfurados del ajo	36
3.12 Resumen de la evidencia de los compuestos activos del ajo	39
4. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS COMPUESTOS Y/O PREPARACIONES DEL AJO	41
4.1 Especies reactivas de oxígeno	41
4.1.1 Formación de las especies reactivas de oxígeno	42
4.1.1.1 Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	42
4.1.1.2 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	43
4.1.1.3 Radical hidroxilo (OH^{\cdot})	44
4.2 Enzimas antioxidantes	44
4.2.1 Superóxido dismutasa (SOD)	44
4.2.2 Glutatión peroxidasa (GSH-Px)	45
4.2.3 Catalasa (CAT)	47
4.3 Especies reactivas de nitrógeno	48

J

5. EFECTO PROTECTOR DEL AJO EN MODELOS EXPERIMENTALES	49
<i>in vivo e in vitro</i>	
5.1 Efecto antioxidante de los compuestos del ajo	49
5.2 Efecto antioxidante de los compuestos del ajo en estudios <i>in vivo</i>	50
5.3 Efecto antioxidante de los compuestos del ajo en cultivos celulares y tejidos	51
5.4 Efecto antioxidante directo en estudios <i>in vitro</i> con compuestos del ajo	51
6. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	53
6.1 Justificación	53
6.2 Antecedentes y contenido innovador	55
6.3 Objetivos y metas	57
6.4 Metodología	58
7. DISCUSIÓN	62
8. PERSPECTIVAS	63

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Aspectos generales.

El ajo pertenece a la familia Alliaceae, su nombre científico es *Allium sativum*, que se deriva de la palabra Celta "all" que significa acre o pungente, y del latín "sativum" que significa cultivado (1,2). En 1956 Helm describe las principales variedades hasta hoy conocidas (2):

- a) *Allium sativum* L. var. *sativum* (cuello blando, esta variedad no tiene flores).
- b) *Allium sativum* L. var. *ophioscorodon*.
- c) *Allium sativum* L. var. *pekinese*.

Su clasificación botánica se describe en la siguiente tabla:

Tabla 1. Clasificación botánica del ajo (2).

Género	<i>Allium</i>
Familia	Alliaceae
Orden	Asparagales
Superorden	Lianae
Clase	Monocotiledóneas

1.2 Características morfológicas de la planta.

El ajo es una planta perenne y monocotiledónea (3), estrechamente relacionada con la cebolla (*Allium cepa*), una planta completa de ajo en su máximo desarrollo está constituida de las siguientes partes (4) (Fig. 1):

1. **Raíces:** son de color blanco, con dimensiones de 0.1-0.5 mm de diámetro, que llegan a profundizar en la tierra hasta 40-50 cm.
2. **Tallo:** es propiamente un disco subterráneo, de donde nacen las raíces y cuyas yemas dan lugar a las hojas y a los dientes que formarán la cabeza. Tiene un pseudotallo, el cual llega a medir alrededor de 90 cm de altura.
3. **Bulbo:** es también conocido como cabeza de ajo, está constituido por las yemas axilares de las hojas, desarrolladas y transformadas en órganos de reserva. Cada yema origina un diente de ajo.
4. **Hojas:** las hojas son opuestas, lineales, de unos 45-60 cm de largo.
5. **Flores:** están formadas por 6 pétalos de color blanco o rosado, y florecen en verano.
6. **Frutos:** las flores rara vez dan lugar a frutos y a verdaderas semillas viables.

En el cultivo del ajo, se conoce tradicionalmente como "semilla" a los dientes que se utilizan en la plantación o las cabezas de donde proceden estos dientes (4).



Fig. 1. Partes principales de la planta de ajo, (1) cabeza de ajo que se subdivide en los dientes, (2) bulbo o cabeza de ajo, (3) las hojas típicas de esta familia, (4) las flores de color rosa y (5) plantas completas en desarrollo.

La ciudad de Gilroy, California (sur de San José, Estados Unidos) es considerada como la capital mundial del ajo, ya que su clima es apropiado para el desarrollo de esta planta. California es el estado con mayor producción de ajo en Estados Unidos (1).

1.3 Investigación

El ajo ocupa un lugar importantísimo en la historia culinaria así como de la medicina popular y creencias de casi todas las religiones e incluso es parte de las más diversas tradiciones mágicas en todo el mundo, especialmente en el oriente de Europa y Asia. Además en el occidente europeo hay un alto consumo de suplementos con ajo, y en el continente americano ha ido creciendo principalmente en los Estados Unidos donde el

consumo total de ajo en 1994 fue de 199 toneladas (cerca de 2.5 g por persona diariamente). Mientras tanto, en Alemania el 8% de la población consume suplementos de ajo (5), debido a que se le atribuyen varias propiedades terapéuticas como antimicótico, antimicrobiano, anticancerígeno, cardioprotector, inmunosupresor, hipoglicémico, hipolipémico, antioxidante, entre otras. La gran mayoría de estos efectos se deben a los compuestos organosulfurados que están presentes en las diferentes preparaciones o presentaciones del ajo, los cuales también son los responsables del olor característico de esta planta. Además que es uno de los vegetales que contiene niveles elevados de selenio (0.28 µg/g de peso fresco) (6), el cual forma parte de algunas enzimas antioxidantes. Las propiedades medicinales de los compuestos del ajo que contiene selenio se encuentran en estudio (6,7).

Cuando los dientes de ajo se cortan, la enzima alinasa actúa sobre la alina, el componente organosulfurado presente en mayor proporción en el diente de ajo, generando la alicina, un compuesto con un olor característico, la cual se descompone casi espontáneamente a mono-, di-, y trisulfuros, compuestos altamente olorosos.

Otros componentes del ajo son: manganeso, cobre, zinc, boro, cloro, yodo, calcio, fósforo, hierro, sodio, potasio, vitaminas A, B, C y nicotinamida, germanio, proteínas, grasas, hidratos de carbono, celulosa y agua (1) (ver el capítulo 3).

La gran cantidad de investigaciones científicas conducidas, principalmente a partir del siglo XX, han confirmado muchos de los efectos terapéuticos atribuidos al ajo en la medicina popular desde la antigüedad. De 1900 a 1996 se publicaron un total de 1158 estudios farmacológicos y aproximadamente 650 estudios químicos del ajo y sus compuestos, haciendo con esto que sea una de las plantas más estudiadas. Todos los estudios farmacológicos (Tabla 2) han incluido 208 estudios en humanos y se han enfocado principalmente sobre los efectos cardioprotectores (total 344), anticancerígenos (total 221), antimicrobianos (total 252) y antioxidantes (total 60). Además se han publicado 105 estudios toxicológicos y 42 estudios referentes al metabolismo de los compuestos del ajo; para hacer un total de 1990 estudios (3), sin incluir estudios botánicos y agrícolas. Más de 40 países han contribuido a esta vasta literatura, incluyendo Alemania, India, y los Estados Unidos, en los cuales se han realizado el 63% del total de las investigaciones (3).

Las revisiones más extensas del tema han sido publicadas en 1996 por Koch y Lawson (3), en un trabajo en el que se incluyen 2250 referencias (2,3), en donde se describen las evidencias de los efectos farmacológicos de muchos de los compuestos activos. Otras revisiones recientes sobre la química del ajo y los compuestos con azufre y selenio fueron realizadas por Block (8-10). Otras revisiones son las realizadas por Lawson sobre los efectos cardiovasculares (11), Sendi sobre el análisis de ajo fresco (12), Reuter (13) y Srivastava (14) sobre sus efectos farmacológicos, Agarwal (15) sobre los efectos cardiovasculares y Bradley (16), Leung & Foster (17) y Weiss (18) sobre aspectos generales.

Tabla 2. Estudios farmacológicos del ajo (1900-1996)* (2,3).

EFFECTOS	TOTAL DE ESTUDIOS	ESTUDIOS EN HUMANOS
Cardiovascular	344	104 (2) ^b
Lípidos en sangre	179	62
Presión sanguínea	78	18
Fibrinólisis, coagulación, flujo	51	18
Agregación plaquetaria	76	6
Aterosclerosis (formación de ateromas)	23	2
Antimicrobiano	252	35
Cáncer	221	12 (10) ^b
Antioxidante	60	4
Hipoglucémico	28	3
Estimulación del sistema inmune	15	3
Antiinflamatoria	11	1
Padecimientos gastrointestinales	43	27
Respiratorio	11	5
Antídoto contra envenenamiento con metales pesados	28	1
Otros 18 efectos	145	12
Total de estudios farmacológicos	1158	208

* incluye sólo estudios actuales: en humanos y animales (*in vivo*) y estudios *in vitro*, no incluyen los que son revisiones, comentarios, patentes y Farmacopeas, además se publicaron 44 estudios en la primera mitad de 1997, el 48% de los cuales estudiaron el efecto del ajo sobre el cáncer.

^b estudios epidemiológicos.

En la Fig. 2 se muestra el número creciente de publicaciones acerca del ajo registradas en el PubMed (Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos, en Bethesda). Se observa que a partir de mediados de la década de los noventa se han publicado

poco más de la mitad del total de 1645 de trabajos registrados hasta 2002. Además cabe señalar que antes de la impresión del presente trabajo, se tenía un registro de un total de 1626 artículos (en diciembre de 2002) y en febrero del 2003 la cifra ascendió a 1645, además de que existen 11 publicaciones del 2003.

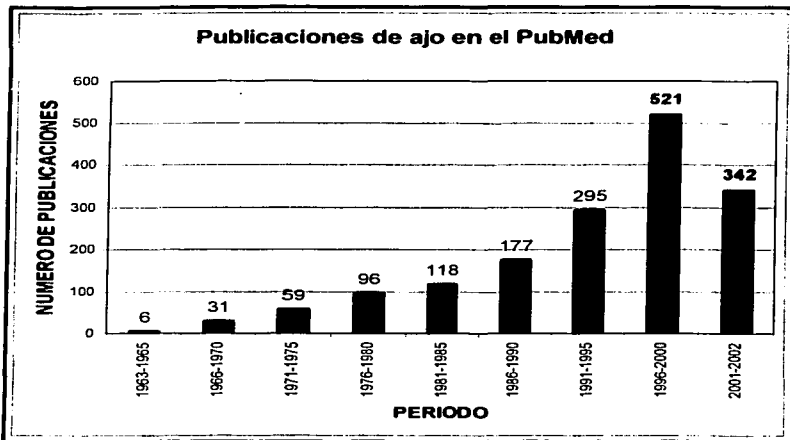


Fig. 2. Publicaciones de ajo de 1963 a 2002, base de datos del PubMed. (Total de publicaciones=1645; y 11 del 2003).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2. ASPECTOS HISTÓRICOS

Orígenes

Se cree que el ajo tiene sus orígenes en Asia Central, y que ha sido cultivado en el medio oriente por cerca de 5000 años (19-21), razón por la cual puede ser considerada como una de las primeras plantas cultivadas por la humanidad. Los primeros registros son de los Sumerios de Mesopotamia, los cuales se encontraban situados en la región de los ríos Tigris y Éufrates (3). Posteriormente, su uso se extendió alrededor del mundo, desde los climas cálidos del Mediterráneo hasta los climas fríos de Siberia (1).

India

En la India el ajo se utilizó como loción antiséptica para lavar heridas y úlceras, también llegó a formar parte de la medicina popular y fue recopilado en el libro de la medicina Ayurvédica (ciencia de la vida) en el año 500 d.C. (1-3). En 1979, GS Sainani y sus colegas del Colegio de Medicina de la Universidad de Poona; publicaron los resultados de un estudio epidemiológico realizado a 3 poblaciones que consumían diferentes cantidades de ajo y cebolla (22). Los sujetos eran vegetarianos que habitaban en la comunidad de Jain, los cuales consumieron ajo y cebolla en cantidades abundantes (50 g de ajo y 600 g de cebolla por semana), en cantidades pequeñas (no más que 10 g de ajo y 200 g de cebolla por semana) o nunca los habían consumido en sus vidas. El grupo que no consumió ni ajo, ni cebolla presentó el tiempo de coagulación de la sangre más corto. Este grupo presentó, además, los niveles de fibrinógeno en el plasma sanguíneo más altos. Estudios realizados durante la década de los 70's demostraron que tanto el ajo como la cebolla inhiben la agregación plaquetaria (22).

Israel

El ajo se menciona en la Biblia por los israelitas cuando, después de 430 años de vivir en Egipto, van de camino a la tierra de Canaán. El libro de Números capítulo 11 versículo 5 dice: *"Nos acordamos del pescado que comimos en Egipto de balde, de los cohombros, de los melones, de los puerros, de las cebollas y de los ajos"*. Estos datos son de alrededor del año 1400 a.C. (22).

Egipto

Los antiguos egipcios lo usaban como una especie de moneda, sus poderes medicinales y mágicos fueron descritos en las paredes de los antiguos templos, como en la Gran Pirámide de Cheops, y sobre los papiros que datan del año 1550 a.C. El Codex Ebers (Fig. 3), es un papiro médico en el cual se encuentran más de 800 fórmulas terapéuticas, de las cuales 22 incluyen al ajo como un remedio efectivo para una amplia variedad de padecimientos incluyendo problemas cardíacos, cefaleas, picaduras o mordeduras de serpientes y tumores. También se tienen registros de que algunos dientes de ajo fueron colocados en la tumba del Rey Tutankamon, lo cual resalta su importancia para esta cultura. A lo largo de la historia el mundo se ha dividido en 2 grandes grupos: los que aman el sabor y el olor del ajo y los que lo detestan. En el primer caso se encuentran los Faraones Egipcios, quienes eran sepultados con singulares materiales como diversos tipos de arcillas y maderas talladas con ajos y cebollas, esto último con la creencia de que la comida elaborada después de la muerte estaría mejor sazonada si contaba con estos dos ingredientes (8,22).

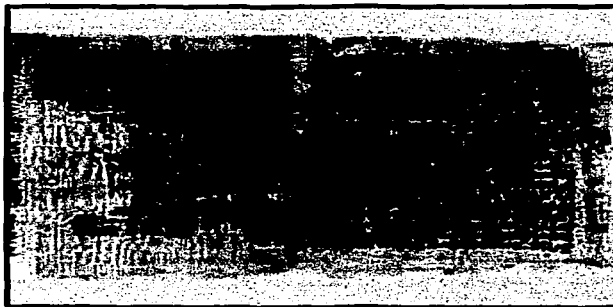


Fig. 3. El Codex Ebers, un papiro médico Egipcio en el cual se encuentran más de 800 fórmulas terapéuticas, de las cuales 22 incluyen al ajo como un remedio efectivo para diversos padecimientos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

China

En China, el ajo fue usado ampliamente para propósitos medicinales, esto está registrado en el texto médico chino más importante y que data del año 500 a.C. (3). En la medicina tradicional, el ajo era conocido como *da suan* y fue considerado como una planta con efectos específicos que actuaba en el intestino grueso, bazo y estómago. Fue utilizado para disminuir la presión de la sangre, para el tratamiento de infecciones por parásitos, comida envenenada y tumores, además de como un suave anticoagulante. Sin embargo, los monjes Budistas lo prohibieron en la elaboración de la comida porque se pensaba en aquel entonces que poseía propiedades afrodisíacas o de estimulación sexual (22).

Grecia

El ajo fue utilizado por el médico, Hipócrates (460-370 d.C.) (3), quien es considerado el "Padre de la Medicina", para tratar infecciones, neumonía, cáncer, problemas digestivos, poliuria. Además Galeno y Aristófanés, también recomendaron al ajo por sus efectos medicinales. Dioscórides, un griego quien vivió en el primer siglo d.C. conocido como el "Padre de la farmacia" recomendó triturar o aplastar los ajos para aplicarlos en las zonas de mordeduras de serpientes, conejos y perros, como un remedio para la tos, para "limpiar" las arterias, para el tratamiento de infecciones como la lepra (3). Además durante los primeros juegos olímpicos, se observó que el ajo producía un efecto estimulante cuando era ingerido por los atletas, por lo cual se utilizó para fortalecerlos (3,22) y para tratar las heridas que se producían en las batallas durante esta época (22).

Roma

Los romanos Plinio (23-79 d.C.), Celsus (25 a.C.- 50 d.C.) y Galeno (129-199 d.C.) citaron numerosos usos terapéuticos para el ajo y la cebolla. Galeno fue el médico personal del Emperador Marco Aurelio y escribió muy influenciado por el occidente y la medicina arábiga (Sistema Unani Tibb). Durante muchos años los romanos llamaron al ajo el "theriac (cura todo) del campesino". Dioscórides, el jefe médico de la armada de Roma en el primer siglo d.C., prescribió al ajo como un vermífugo, o eliminador de parásitos intestinales (3).

Arabia

Los herbalistas árabes usaron el ajo para el tratamiento del dolor abdominal, cólico infantil, diarrea, diabetes, infecciones oculares, mordeduras o picaduras de serpiente, caspa y tuberculosis (22).

África

Los herbalistas africanos usan el ajo para el tratamiento de infecciones respiratorias e infecciones por helmintos; y además muchas familias africanas utilizan gotas de aceite de ajo para tratar infecciones óticas pediátricas. En la medicina Ayurvédica, el ajo es usado para el tratamiento de problemas respiratorios, úlceras, cólicos y flatulencias y también se utilizaban gotas de aceite de ajo para tratar el dolor de oídos. También era recomendado tradicionalmente para inducir abortos (22). Albert Schweizer, en el inicio y mediados del siglo XX utilizó el ajo en África para curar el cólera y la fiebre tifoidea al igual que para combatir la disenteria en este país (3,22).

Alemania

Durante la Edad Media, Hildegarda de Bingen, una monja alemana escribió dos libros de medicina en los cuales recomendaba el consumo de ajo crudo para mejorar la salud. En esta época, el ajo se usó para desviar el mal de ojo, alejar a seres mágicos como brujas y vampiros, y también fue utilizado como un afrodisíaco, lo que constituyó la época más significativa de la utilización del ajo con fines mágicos, además de sus propiedades medicinales (3).

En 1844, el químico alemán Theodor Wertheim encontró que el ajo principalmente contiene azufre, en ese entonces, se le llamó a la preparación utilizada "aceite de ajo". Todo lo que se conocía acerca de este producto era limitado, debido quizá a que el producto puro era obtenido por destilación con vapor de los bulbos de *Allium sativum*, lo cual se realiza todavía, pero hoy en día se consume en mezcla con otros aceites naturales. Se observó que los compuestos que lo constituían tenían en su estructura azufre y, más adelante fue considerado como un material muy prometedor para dar resultados muy útiles para la medicina por las propiedades mostradas. Para realizar la destilación por arrastre de vapor ellos colocaron el ajo en agua y calentaron a ebullición, el vapor obtenido del matraz por condensación producía pequeñas cantidades del llamado "aceite de ajo". Observaron también que la destilación de este aceite produce algunas sustancias volátiles con un olor fuerte. Ellos propusieron el

nombre de aliilo (de *Allium*) para el grupo hidrocarburo del aceite, y alilsulfuro para los volátiles. La palabra "aliilo" es usada también ahora, y se refiere a las estructuras con grupos $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2-$, lo que de forma abreviada es C_3H_5- .

En 1892 otro investigador alemán, el químico FW Semmler, aplicó la destilación por arrastre de vapor a los dientes de ajo, obteniendo 1-2 g aceite/Kg de ajo. De dicho aceite se obtuvo dialil disulfuro (DADS), acompañado por pequeñas cantidades de dialil trisulfuro (DATS) y dialil tetrasulfuro (DATTS) (3,22).

Inglaterra

El Colegio Inglés de Medicina también recomendó consumir ajo para el tratamiento de envenenamientos, picaduras, edema, úlceras, y dolores dentales y además para el tratamiento de la peste en Londres en el año de 1665. Por otro lado Sydenham (1624-1689), un destacado médico inglés, usó el ajo para la cura de la viruela (2,3). Durante la primera guerra mundial el ajo fue utilizado tópicamente para curar heridas de infecciones, y para el tratamiento de la disentería (2,3).

En laboratorios de investigación, se demostró que el jugo de ajo diluido 1/125,000, inhibe el crecimiento de bacterias del género *Staphylococcus*, *Vibrio* (incluyendo *Vibrio cholerae*) y *Bacillus* (incluyendo *B. thyposus*, *B. dysenteriae* y *B. enteritidis*). El jugo del ajo exhibió un amplio espectro de actividad antimicótica contra diversas variedades de levaduras incluyendo algunas que causan vaginitis (22).

Francia

Se observó que los caballos experimentaban coagulación retardada en las extremidades inferiores cuando se alimentaban con una dieta rica en ajo y cebolla (22). La epidemia del cólera en Francia y Bulgaria fue curada con el ajo. En 1858, Luis Pasteur realizó un estudio en el que observó que el ajo y la cebolla podrían terminar con la causa de las infecciones demostrando con esto, la actividad antiséptica del ajo.

Rusia

En la Segunda Guerra Mundial el ajo fue muy popular entre los soldados y fue conocido como la "Penicilina Rusa", utilizado principalmente en la prevención de la gangrena (2,3,22).

Estados Unidos

Chester J Cavallito y sus colegas en el Sterling-Winthrop Chemical Company en Rensselaer, N.Y. hicieron en 1944 un descubrimiento clave en la química del ajo. Ellos establecieron métodos menos vigorosos que la destilación por arrastre de vapor y obtuvieron sustancias diferentes. Cavallito aplicó un solvente orgánico, el alcohol etílico a 4 Kg de ajo y los dejó en maceración a temperatura ambiente y con lo cual obtuvo aproximadamente 6 g de un extracto oleoso cuyo componente principal tiene la fórmula estructural $C_6H_{10}S_2O$. El extracto poseía características tanto antibacterianas como antifúngicas. Químicamente el compuesto descubierto por Cavallito es el **óxido de dialil disulfuro, 2-propentiosulfinato** o **dialil tiosulfinato**, la principal sustancia aislada por Semmler con su destilación por arrastre de vapor pero aproximadamente medio siglo más tarde. Cavallito llamó a esta molécula **alicina**. Ésta es químicamente inestable, es un líquido poco colorido que contribuye al olor del ajo crudo más que los **dialil sulfuros**.

La **alicina** actualmente está sujeta a 2 patentes en USA, con el nombre que Cavallito le asignó al aislarla e identificarla (2,23). Ya que la alicina es el principal compuesto responsable del olor del ajo crudo cortado, un bulbo de ajo entero exhibe poco este olor, sólo cuando es cortado o triturado éste se hace claramente evidente. En 1948 Arthur Stoll y Ewal Seebeck de la Compañía Sandoz en Basel demostraron que cortando o triturando los dientes de ajo, tiene lugar la formación de la alicina. Hoy en día, los estándares europeos especifican que los suplementos de ajo deben contener no menos de 0.45% de alicina (1).

En la década de los 80 médicos norteamericanos recomendaron la inhalación de ajo como un tratamiento para la tuberculosis (22).

3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AJO Y DE SUS DIFERENTES PREPARACIONES Y EXTRACTOS.

Como se mencionó en el capítulo anterior, el ajo, se ha consumido tradicionalmente como un remedio y como una medicina popular desde hace muchos años en todo el mundo, debido a que se le atribuyen diferentes propiedades, como: antimicrobiano, antimicótico, antineoplásico, cardioprotector, inmunosupresor, hipoglucémico, hipolipémico, y antioxidante. Hasta la fecha existen un sin fin de publicaciones que gradualmente han ido confirmando los efectos benéficos que tradicionalmente se atribuían al ajo. Estos efectos se deben a los compuestos organosulfurados presentes en alta concentración en las diferentes preparaciones del ajo. Además, es uno de los vegetales que contiene niveles elevados de selenio, lo que contribuye principalmente a sus propiedades antineoplásicas (3). Los compuestos más abundantes de los dientes de ajo se muestran en la tabla 3 (3).

Tabla 3. Composición química de los dientes de ajo (mg/g peso fresco) (3).

Agua	620-680	Adenosina (0 antes de aplastar)	0.1 (8 h)
Solubles en agua	310-370	Saponinas	0.4-1.1
Carbohidratos	260-300	Vitaminas	0.15
Fructanos	220-250	Acido ascórbico	0.14
Fibras	15	Tiamina	0.002
Proteínas	15-21	Riboflavina	0.0008
Aminoácidos	10-15	Minerales	7
Arginina	5-8	Potasio	4.4
Compuestos organosulfurados	11-35	Fósforo	1.8
Sulfóxidos de cisteína	6-19	Calcio	0.24
γ-glutamil cisteínas	5-16	Magnesio	0.18
S-aliquenil cisteínas	0.01-0.03	Sodio	0.11
Escordiminas	0.03	Hierro	0.02
γ-Glutamilfenilalanina	0.4-1.1	Cromo	0.0005
Lípidos	1-2	Selenio	0.0002
β-sitosterol	0.015	Germanio	0.00004
Ácidos fenólicos	0.04	Azufre	2.3-3.7
Acido fítico	0.8	Nitrógeno	6-13

Los datos son de Koch y Lawson (2) en el cual también se incluyen los compuestos menos abundantes.

*menos que 2% de lo recomendado en la dieta de los Estados Unidos si se consumen 3-4 g de diente de ajo.

El consumo del ajo, se debe principalmente al sabor que otorga a los alimentos y a sus propiedades benéficas para la salud, ya que su contenido de vitaminas y minerales, comparado con otros vegetales, es bajo (menos de 2% de lo que se necesita diariamente si se consumen 2-4 g, o un diente típico de ajo). Algunas características adicionales del ajo son su **bajo contenido de humedad** (62-68% comparado con el 80-90% que tienen otras frutas y vegetales), su alto contenido de **fructanos**, polímeros de fructosa de 10-60 unidades (3,24) que constituyen cerca del 65% de su peso seco; su alto contenido de **aminoácidos** libres, similar a su contenido de **proteínas** (principalmente arginina); y su muy bajo contenido de lípidos y otros compuestos liposolubles.

Sin embargo, la más sobresaliente de sus características es sin lugar a duda, su alto contenido de compuestos organosulfurados **99.5%** del cual contiene el aminoácido sulfurado **cisteína**, aunque la cisteína por si sola no se encuentra presente en el ajo. El contenido de **azufre** en el ajo (cerca de 3 mg/g) es 4 veces más grande que el de otros vegetales y frutas que lo contienen, por ejemplo la cebolla, el brócoli, la coliflor y el chabacano (2,3). En la Fig. 4 se muestra una gráfica donde se compara el contenido de azufre en el ajo con respecto a otros productos utilizados comúnmente en la elaboración de los alimentos.

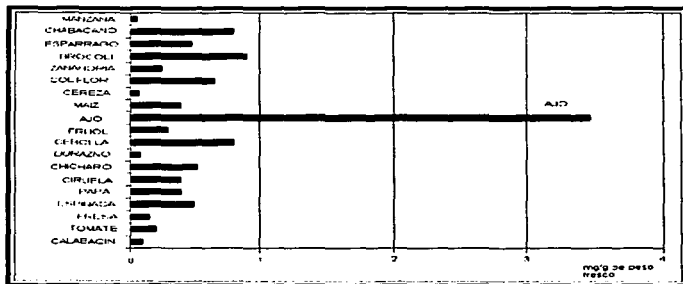


Fig. 4. Comparación del contenido de azufre del ajo con otros vegetales y frutas (2).

3.1. Compuestos con selenio.

Como ya se había mencionado el ajo es uno de los alimentos con mayor contenido de selenio (0.28 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco) (6), aunque la cantidad de selenio en un solo diente de ajo es muy pequeña. El contenido de selenio en el ajo puede aumentar 2,500 veces

cuando este se cultiva en suelos ricos en este elemento. Las propiedades anticancerígenas del ajo con alto contenido de selenio son mayores que las del ajo con contenido normal de selenio (2,3,6,25). Esto es, en los compuestos que tienen gran cantidad de selenio, puede haber un reemplazo de esta especie por el azufre presente en los compuestos derivados de cisteína. Es así como el compuesto más abundante de selenio en el ajo, es la **selenocisteína (cys-SeH)**, seguido de la **Se-metil selenocisteína** (6,9,26,27). Se cree que dichos compuestos se originan a partir del ion selenito (SeO_3^{2-}) o selenato (SeO_4^{2-}). En la Fig. 5 se muestran las estructuras de los 2 compuestos principales de selenio presentes en el ajo.

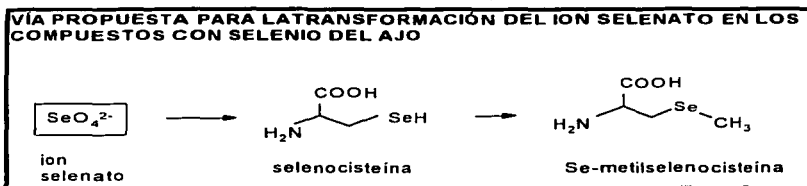
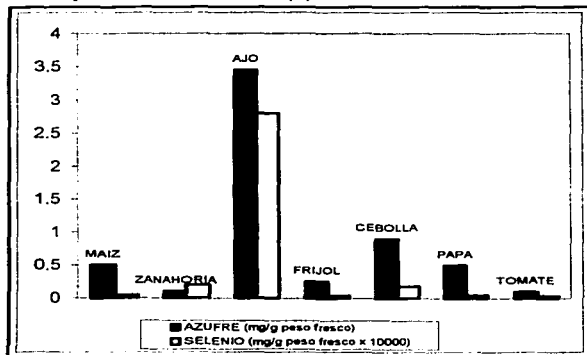


Fig. 5. Síntesis propuesta de los compuestos de selenio en el ajo (3).

En la Fig. 6 se muestra una gráfica donde se compara el contenido de azufre y selenio en el ajo con otros alimentos (6).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. 6. Tabla de comparación del contenido de azufre y selenio en el ajo con respecto a otros alimentos.

3.2 Compuestos con azufre.

La gran mayoría de las investigaciones analíticas y farmacológicas del ajo están enfocadas a sus **compuestos con azufre u organosulfurados**. Esto se debe, no sólo por su abundancia en el ajo, sino también porque son los que se sabe que producen los efectos que se le atribuyen a esta planta en los niveles típicos en que se consume. En la tabla 4 se presenta una lista de los compuestos organosulfurados que se encuentran en mayor cantidad en el ajo (3).

Tabla 4. Principales compuestos organosulfurados en el ajo entero y molido (2,3).

Compuesto	Ajo entero MG/G peso fresco	Ajo molido MG/G peso fresco
S-Alquil-L-cisteína sulfóxidos		
Allil cisteína sulfóxido (alina)	6-14	nd
Metil cisteína sulfóxido (metina)	0.5-2	nd
trans-1-propenil cisteína sulfóxido (isocalina)	0.1-1.2	nd
Cicloalina	0.5-1.5	0.5-1.5
γ-L-glutamil-S-alkil-L-cisteínas		
γ-L-glutamil-S-trans-1-propenil cisteína	3-9	3-9
γ-L-glutamil-S-all cisteína	2-6	2-6
γ-L-glutamil-S-metil cisteína	0.1-0.4	0.1-0.4
Alquilalcanotiosulfínatos		
Allil 2-propentiosulfínato (alicina)	nd	2.5-4.5
Allilmetiltiosulfínatos (2 isómeros)	nd	0.3-1.5
Allil trans-1-propeniltiosulfínatos (2 isómeros)	nd	0.05-1.0
Metiltrans-1-propeniltiosulfínatos (2 isómeros)	nd	0.02-0.2
Metilmetanotiosulfato	nd	0.05-0.1

Casi todo el **azufre (95%)** en los dientes de ajo enteros se encuentra presente en 2 clases de compuestos de abundancia similar: los **S-alkil cisteína sulfóxido** y las **γ-glutamil S-alkil cisteínas** (tabla 4). Ambos tipos de compuestos están sustituidos en el átomo de **azufre** con un grupo **alilo** (2-propenilo), **isocalilo** (trans-1-propenilo) o por grupos **metilos**. El compuesto sulfurado más abundante en el ajo es la **alina (sulfóxido de S-all cisteína)** (2,3,11), el cual se encuentra presente comúnmente en cantidades de 10 mg/g de peso fresco o 30 mg/g de peso seco (ya que el ajo contiene cerca de 62-68% de agua, los valores de peso seco, son usualmente 3 veces los valores de peso fresco) y representa el **80% del total de sulfóxidos de cisteínas**. La alina no se encuentra en la cebolla (*Allium cepa*) y es mucho menos abundante en otras especies del género *Allium* como *A. ursinum* (ajo silvestre), *A. ampeloprasum* (ajo elefante), y *A. tuberosum* (cebollinos chinos).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Parece ser que la **serina** participa en la biosíntesis de la alina, pero no se sabe el origen del grupo S-alilo para dar la forma inmediata S-alil cisteína, el cual **rápidamente se oxida a alina** (2). Mientras las **γ -glutamil cisteínas** son precursores de la **alina e isoalina** durante la germinación de la planta debido a que la enzima **γ -glutamiltanspeptidasa** actúa llevando a cabo una **hidrólisis** y una subsiguiente **oxidación** de las anteriores. Ya que los sulfóxidos de cisteína son los principales precursores de los compuestos responsables de los efectos farmacológicos del ajo, o al menos son los más estudiados, a las γ -glutamil cisteínas no se les ha establecido todavía bien sus efectos, ya que han sido usadas escasamente en los estudios hasta hoy realizados, su importancia radica principalmente en que son los precursores de la S-alil cisteína (SAC) un compuesto con propiedades antioxidantes como se menciona más adelante.

La transformación de los compuestos organosulfurados del ajo. Los dientes de ajo intactos contienen altas concentraciones de **γ -glutamil cisteínas**, estos compuestos pueden ser oxidados para dar **alicina (tiosulfínatos)**. Cuando el ajo sufre algún proceso mecánico, esto es cuando es cortado y/o triturado, la **enzima vacuolar alinasa**, rápidamente actúa sobre la alina para formar la alicina, y ésta última debido a su inestabilidad y a diferentes condiciones de tratamiento da lugar a la formación de otros compuestos como se describirá más adelante. Al mismo tiempo, las γ -glutamil cisteínas son convertidas en **S-alil cisteína (SAC)** a través de una vía diferente de la vía alina/alicina. En la Fig. 7 se ilustra la transformación de las γ -glutamil cisteínas a tiosulfínatos.

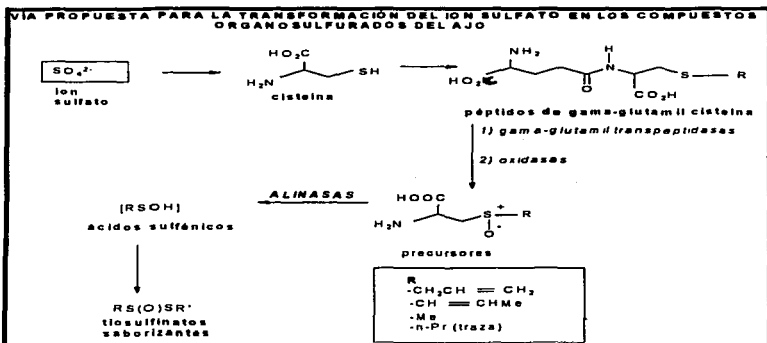


Fig. 7. Proceso de transformación del ion sulfato en los compuestos organosulfurados.

Existen diversos estudios que indican que la biodisponibilidad de la alicina es pobre ya que después de la ingesta de ajo crudo o de alicina pura, esta no se detecta en la sangre o en la orina, por lo que su posible uso terapéutico es muy limitado debido a su gran inestabilidad y debido a que existen pocas presentaciones comerciales disponibles en México que especifiquen el contenido de alicina. Además algunos de estos estudios apoyan fuertemente la idea de que es poco probable que la alicina como tal contribuya a los efectos benéficos del ajo, ya que se han estudiado con más frecuencia los compuestos obtenidos a través de su transformación. En la Fig. 8 se esquematiza la formación de la alicina después de que el ajo es cortado (2,3).

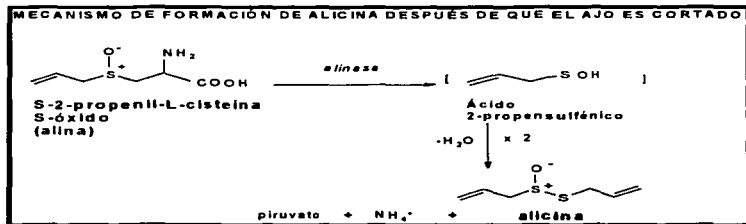


Fig. 8. Mecanismo de transformación de la alicina después de que el ajo es cortado.

Dependiendo de las condiciones de extracción a que sea sometido el ajo, se obtendrán diferentes compuestos como se ilustra en la Fig. 9 (22).

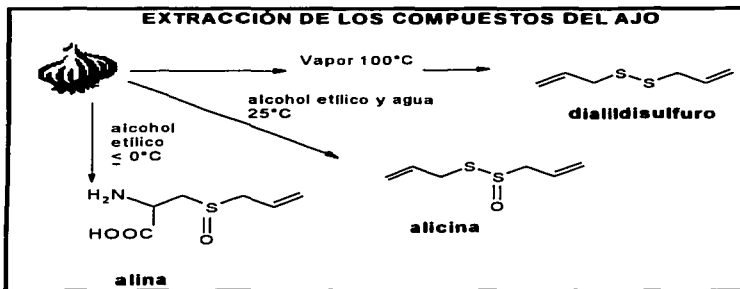


Fig. 9. Condiciones de extracción de algunos compuestos sulfurados del ajo entero.

3.3. Variaciones naturales de los compuestos sulfurados del ajo.

Todas las especies de las plantas varían en algún grado en su contenido y/o características las cuales las hacen particulares y únicas, debido quizá a su localización geográfica en el mundo, su composición estructural, al clima donde crecen, o a simples diferencias en las variedades e incluso las fechas en que son levantadas sus cosechas, y al manejo que se les da después de la misma. El tamaño de estas diferencias es importante, especialmente para la composición del material vegetal del que se trate sobre todo si contiene compuestos de los cuales se tiene una mínima sospecha de actividad; es así como, se les debe dar un seguimiento, ya que son los que probablemente sean la causa de los efectos farmacológicos observados al consumir dicha especie. Cerca del **85% de la alina** y de otros **sulfóxidos de cisteína** de la planta se localizan en el **bulbo**, más o menos un **12% en las hojas** y **2% en la raíz**; mientras las **γ -glutamil cisteínas** se localizan sólo en los **bulbos** (3), es por eso que esta es la parte utilizada para los estudios de investigación antes mencionados. Es importante mencionar que las cantidades de alina y de las γ -glutamil cisteínas presentes en los bulbos incrementan en las **cuatro semanas** previas al levantamiento de la cosecha (28,29). Además se encontraron datos de que la **alina** aumenta cerca del **25%** durante el proceso típico de cura al que se somete la planta (secado en la sombra

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

por lo menos 2 semanas) y que extendiendo las fechas de cosecha normales por aproximadamente 2 semanas (esperando hasta que las plantas son casi de color café), incrementa el contenido de estos compuestos cerca del **20% adicional** sobre su peso seco. Por lo tanto, una cuidadosa selección de la fecha de cosecha puede ser muy importante en el estudio de estos compuestos.

En un estudio realizado con 16 especies de ajo de **tallo blando** (*A. sativum* var. *sativum*) la variedad que crece en California y el comúnmente encontrado en las tiendas de comestibles o abarrotes y 53 especies de **tallo duro** (*A. sativum* var. *ophioscorodon*) se observaron diferencias significativas en los contenidos de alina y de γ -glutamil cisteínas (3), lo cual nos indica que efectivamente existe variabilidad entre las especies existentes.

3.4. Formación enzimática de los tiosulfínatos cuando el ajo es cortado y triturado.

Cuando los dientes de ajo son cortados, triturados o bien masticados (o cuando el polvo de ajo seco se hidrata, en un medio no ácido), los **sulfóxidos de cisteína** que son poco olorosos e insolubles en solventes orgánicos, son transformados rápidamente a una nueva clase de compuestos, los **tiosulfínatos**, los cuales contienen **2 átomos de azufre** (ya que son derivados de 2 moléculas de sulfóxido de cisteína con la pérdida de piruvato y amonio), y éstos son más solubles en solventes orgánicos que en agua, y además son un tanto volátiles, por lo cual esta propiedad los hace responsables del olor producido inmediatamente después de ser cortados los dientes (2,3).

La conversión de los sulfóxidos de cisteína a tiosulfínatos por acción de las alinasas es muy rápida en el ajo fresco, ésta se completa en su totalidad aproximadamente 10 segundos (30) en el caso de la alina y en 60 segundos en el caso de la metina. Este tiempo aumenta moderadamente a 30 segundos y a 5 minutos, respectivamente para alina y metina en el caso de polvos comerciales de ajo bajo procesos de secado en horno (18). Los dientes de ajo contienen iguales cantidades de alina y alinasas. Las **alinasas o alininasas (E.C 4.4.1.4.)**, son enzimas complejas, y aunque el polvo de ajo sea almacenado por 5 años se muestra poca pérdida en la formación de alicina. La alinasa es un glicoproteína de PM 55,000 y requiere de fosfato de piridoxal como coenzima. Es una de las proteínas más abundantes del ajo (31,32) y se encuentra activa en un rango de pH 4.5-8 (siendo el pH óptimo un valor de 6.5) (33). En la tabla 5 se presentan las condiciones experimentales en las que se inactiva la enzima alinasa,

esto es útil para impedir la formación de los tiosulfatos los estudios de estos compuestos (2,3).

Tabla 5. Condiciones de inactivación de la enzima alinasa.

- Calentamiento a temperatura de ebullición por 15 minutos.
- Calentamiento en horno de microondas (650 W) por 15-30 segundos.
- Valores de pH menores a 4.5.

Parece que el ajo tiene 3 isoformas de la alinasa, una específica para **alina**, una para **isoalina** y la tercera para **metina**. La última enzima parece ser más sensible al calor que la segunda isoforma, ya que el secado con calor de las rebanadas de ajo decrece la tasa de formación de metil pero no de alil 1-propenil tiosulfatos. Además, esta enzima es inmediata e irreversiblemente inhibida a valores de pH por debajo de 4.5 (34,35). También es inhibida efectivamente por una solución de amino-oxiacetato 10 mM y por el cocimiento normal de los alimentos (consideremos una temperatura de 100°C), pero es poco inhibida por los alcoholes. (3). Es así como al colocar en ebullición los dientes de ajo enteros sin pelar por 15 minutos, o en un horno de microondas (650 W) por 15-30 segundos se **inactiva la alinasa**. Pero quizá, un poco de alicina es formada, probablemente por contacto físico entre los dientes antes de colocarlos a ebullición, ya que esto depende del cuidado que se ponga al separar los dientes ya que puede desprenderse la cáscara que lo envuelve y entonces formarse una pequeña cantidad de tiosulfatos (18). En la tabla 6 se muestran las principales soluciones utilizadas para inhibir la enzima e impedir la formación de tiosulfatos.

Tabla 6. Inhibidores de la formación de alicina (2).

Inhibidor	Concentración que da 90% de inhibición	Concentración que da 100% de inhibición
Aminooxiacetato (carboximetoxilamina)	0.5 mM	10 mM
Hidroxilamina	3 mM	100 mM
L-cicloserina	200 mM	>1000 mM

Concentraciones basadas en la cantidad de alicina formada en 10 minutos después de suspender polvo de ajo entero en la solución inhibidora.

La formación de los **tiosulfatos** toma lugar cuando los **sulfóxidos de cisteína**, los cuales se encuentran almacenados en las células del mesófilo, se ponen en contacto físico con la enzima **alinasa** por algún tratamiento mecánico (como triturado o cortado de los dientes) ya que esta última solo se encuentra localizada en el saco de células

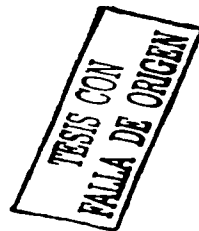
vasculares (36). Con la excepción del anillo aromático cicloalina (formada por ciclización de la isoalina) todos los **sulfóxidos de cisteínas son lisados por la alinasa** a la forma transitoria de **ácidos sulfénicos**, los cuales posteriormente se autocondensan a la forma de **tiosulfínatos**. Debido a la gran abundancia de la alinasa (10 mg/g de ajo fresco) (37), la formación de éstos sulfínatos es bastante rápida, por ejemplo para la alina y la isoalina se han observado intervalos de tiempo de menos de 10 segundos (30) y para la metina cerca de 60 segundos (2,35). Ya que los tiosulfínatos resultan de la condensación de 3 tipos de ácidos sulfénicos, se pueden formar un total de 9 tiosulfínatos; sin embargo, sólo se han encontrado y estudiado 8 (Tabla 4). Debido a la abundancia de la **alina**, el principal tiosulfínato formado cuando el ajo es triturado es la **alicina**, el cual varía en abundancia y alcanza valores de 60-90% del total de los tiosulfínatos. La mayor parte de la **metina** es convertida a 2 **isómeros de aili metil tiosulfínatos: aili metanotiosulfínato, y metil 2-propentiosulfínato**, el primero es 2 veces más abundante que el último (38,39).

3.5. Estabilidad de los tiosulfínatos.

Los **tiosulfínatos** son compuestos auto reactivos que pueden ser totalmente inestables reaccionando por diferentes tipos de mecanismos (40), dependiendo de la polaridad del medio, la temperatura y concentración. Sin embargo por acción de una dilución, por el aumento de la polaridad del solvente o por la presencia de solventes que enlazan hidrógeno con el átomo de oxígeno (agua y un poco menos los alcoholes) **mejoran mucho su estabilidad**, debido a la formación de puentes de hidrógeno del agua con el átomo de oxígeno del compuesto reduciendo así la tasa de auto reacción de estos compuestos. Por ejemplo, en ausencia de solvente o en la presencia de solventes de baja polaridad como hexano o dietil éter, la vida media de la **alicina** a temperatura ambiente es 2-16 horas, sin embargo, en ajo triturado (o jugo de ajo) es de 2.4 días, aumentando a 22 días a una dilución 1:10 con agua y a 60 días a una dilución con 1 mM de ácido cítrico o a una temperaturas de 4°C y disminuye a 4 días en agua a 37°C (41). En la tabla 7 encontramos los valores de vida media a diferentes temperaturas y polaridades del medio en que ésta se encuentre.

Tabla 7. Estabilidad de la alicina en varios solventes (2,3).

Solvente	Temperatura (°C)	Tiempo de vida media (h)
Agua (0.1-2 mg/mL)	23°C	30-40 días
Agua	-20°C	Se pierde 30% en 1 año
Agua	-70°C	No hay pérdidas en 2 años
1 mM ácido cítrico	23°C	60 días
Metanol	23°C	48 horas
Cloroformo	23°C	48 horas
Diclorometano	23°C	30 horas
Etolanol	23°C	24 horas
Acetonitrilo	23°C	24 horas
Dietiléter	23°C	3 horas
Hexano	23°C	2 horas



3.6. Composición del olor del ajo.

La alicina, es el principal constituyente del olor característico del ajo, que está presente sólo en el ajo fresco picado y en polvo (secado a baja temperatura), no así en el aceite destilado o macerado. Además de este compuesto, también están presentes el **metil alil tiosulfinato** y el **alil metil tiosulfinato** (otros tiosulfatinos encontrados en menores proporciones), los cuales también son liberados del bulbo del ajo fresco después de que su tejido es triturado o cortado. Dentro del bulbo de ajo, la alina (inodora) es almacenada en la células del mesófilo, las cuales no contienen la enzima alinasa, ésta se encuentra compartimentalizada dentro de la célula y sólo cuando el ajo se somete a un daño mecánico, la enzima entra en contacto con la alina convirtiéndola en alicina, la cual es transformada posteriormente en los compuestos organosulfurados aliisulfuros o polisulfuros que son olorosos y altamente volátiles. El ajoene es otro de los productos de transformación de la alicina que resulta de la combinación de 3 moléculas de alicina. La conjugación de agentes químicos tóxicos con glutatión y conjugados de cisteína, es, al parecer, la principal defensa celular contra el daño tóxico. Se piensa que la administración oral de ajo no presenta efectos tóxicos, sin embargo se ha informado en la literatura casos de reacciones alérgicas al ajo o a otros miembros de la familia *Allium*, tales como la dermatitis por contacto, asma o irritación a la mucosa gástrica (2).

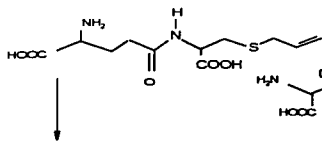
El olor del ajo picado y del aliento después de comerlo han sido siempre características de este condimento. Aunque el olor producido al cortar el ajo fresco se debe principalmente a la **alicina**, los dialiisulfuros empiezan a aparecer después de **30**

minutos de la realización del corte del ajo a temperatura ambiente, mientras que el olor del **ajo cocinado** se debe principalmente al **dialil y alil metil trisulfuros** y en menor proporción a sus **disulfuros** (2,42). Cuando se ingiere el ajo fresco, el olor inicial del aliento se debe principalmente al **alil mercaptano**, sin embargo, este representa el olor retenido en la garganta y desaparece aproximadamente en una hora (43,44). El olor que se almacena en los pulmones (45) asciende lentamente y tarda en ser eliminado más de 24 horas; y consiste principalmente de **alil metil sulfuro (AMS)** (constituye el 87% de compuestos sulfurados 9 horas después de la ingestión) y **dimetil sulfuro** (11%) y se debe al **metabolismo** de los **tiosulfatos** (43,46,47). También se ha detectado en el aliento al **dimetil selenuro** (metil-Se-metil) en niveles que le permiten ser parte de la composición del olor (43). En un reciente estudio se comprobó que los componentes del ajo antes mencionados son transmitidos de madre a hijo a través de la leche materna. En el estudio realizado los bebés mostraron preferencia por la leche de las madres que fueron alimentadas con una dieta rica en ajo, lo que no ocurrió con la leche de las madres que no incluyeron al ajo en su alimentos (48,49).

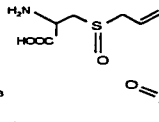
En la Fig. 10 se encuentran las estructuras de los principales compuestos encontrados en los dientes de ajo enteros, en los dientes de ajo picados y los obtenidos por diferentes procesos de extracción.

ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS PRINCIPALES ENCONTRADOS EN EL AJO

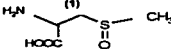
(a) γ -GLUTAMIL-S-ALILCISTEÍNA (4)



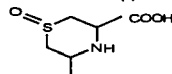
ALINA (10)



METINA (1)



CICLOALINA (1)



(b)

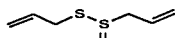
No hay cambios cuando el ajo es cortado o triturado



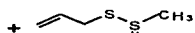
Ácidos sulfénicos

No hay cambios después del procesamiento

Espontáneamente



Alicina (4)

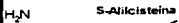


Allimetanotosulfinato (0.6)

Ácido pirúvico

(c) Largos períodos de incubación

Transpeptidasa



S-Allicistaina (2)

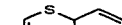
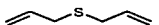


S-1-Propanil cisteína(2)

Ácido glutámico

Destilación con vapor

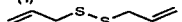
Incubación en aceites o solventes orgánicos



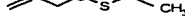
Dialil trisulfuro (1)



2-Vinil-4H-1,3-ditina (2)



Dialil disulfuro (1)



Alli metil trisulfuro (0.7)



Alli metil disulfuro (0.6)



3-Vinil-4H-1,2-ditina (1)



E-Ajoene (0.5)

(a) compuestos en ajo entero, (b) compuestos formados después de que el ajo es cortado o triturado, (c) compuestos después del procesamiento con aceites o por envejecimiento. () cantidades típicas encontradas en el ajo en mg/g de diente.

Fig. 10. Estructuras de los principales compuestos sulfurados del ajo entero, del ajo cortado y triturado, y después del procesamiento con solventes orgánicos y destilación (3).

3.7 Compuestos sulfurados de los productos comerciales del ajo.

Además del ajo crudo o cocinado, el ajo es consumido frecuentemente como un **condimento**, ya sea como **polvo de ajo**, como **sal de ajo**, como **ajos en vinagre** y como suplementos en diferentes formas farmacéuticas (polvo de ajo en tabletas o cápsulas; **aceites encapsulados** extraídos por destilación con vapor; **aceites macerados** en cápsula, y tabletas de EAE, cápsulas y líquido). La gran mayoría de los compuestos encontrados en el aceite de ajo y en el EAE son llamados productos de transformación ya que no se encuentran presentes en el ajo fresco entero, sino que son resultado de la transformación de los compuestos organosulfurados iniciales.

3.8 Transformación de los tiosulfatos en los procesos comerciales.

Los compuestos en los cuales los tiosulfatos son transformados dependen del medio y de la temperatura. En presencia de agua, el DATS, el DADS y el AMTS son los principales productos (Fig. 10). En el aceite comercial de ajo que se produce por destilación por arrastre de vapor empleando dientes triturados se han encontrado 30 diferentes sulfuros, entre los que se encuentran: **dialilo** (57%), **alilmetil** (37%) y **dimetil** (6%) **mono a hexasulfuros**, junto con cantidades traza de **hepta-** y **octasulfuros** y pequeñas cantidades de **alil 1-propenil** y **metil 1-propenil di-, tri-, y tetrasulfuros** (50). A temperatura ambiente en solventes orgánicos, tal como hexano, éter, o aceites triglicéridos (productos de aceite macerado), se forman 2 tipos de compuestos adicionales: las **vinilditinas** que tienen una estructura en anillo y que constituyen el producto principal (70-80%) y el **ajoene (E,Z-4,5,9-tritriadodeca-1,6,11-triene 9 óxido)** que se forma en menor cantidad (12-16%) (50,51). También se forman algunos **alil sulfuros** (DATS, AMS y DADS) (4-18%). **Excepto para el ajoene**, 9 de los tiosulfatos producidos por la transformación conservan el átomo de oxígeno. Esto resulta en gran volatilidad (olor) y baja solubilidad en agua; por ejemplo la solubilidad en agua de la alicina es 1%, mientras que para el DADS es 0.0006% (2,52).

3.9 Cambios por periodos largos de tratamiento (envejecimiento).

Entre los tipos de productos o preparaciones de ajo, el **extracto de ajo envejecido (EAE)** y los **dientes de ajo en conserva o vinagre (AV)** implican un tratamiento largo a temperatura ambiente. El EAE, es elaborado empleando dientes cortados de ajo los cuales son colocados en una solución diluida de etanol al 20% por un periodo de tiempo de 18-20 meses aproximadamente a temperatura ambiente (53,54), mientras

que los AV permanecen almacenados en vinagre (5% de ácido acético), por lo que el tiempo de incubación dependerá de cuando se consuman los dientes (2). Los cambios de composición que toman lugar en estos productos en un periodo superior a 2 años, especialmente en el EAE, son considerables, como se muestra en la tabla 8. El compuesto sulfurado que no es afectado por el tiempo es la cicloalina.

Tabla 8. Cambios en la composición de dientes de ajo picados durante el envejecimiento en 20% de extracto de etanol de ajos picados o de polvo de ajo en ácido acético (en vinagre, conservas).*

COMPUESTO	Tiempo de incubación (meses)				
	0	1	3	12	24
Dientes cortados o picados en 20% de etanol (mg/g extracto seco)					
Alina	5.0	3.2	2.8	2.9	2.7
Alicina	8.3	4.1	0.4	0	0
Alilmetiltiosulfínatos	2.1	1.3	0.4	0	0
Alil sulfuros	0.19	0.14	0.12	0.09	0.08
Cicloalina	3.5	3.6	3.5	4.0	3.6
γ -glutamyl-S-alil cisteína	12.7	5.8	1.1	0	0
S-alil cisteína	0.2	5.9	7.2	7.1	7.2
γ -glutamyl-S-1-propenil cisteína	15.9	3.4	0.5	0	0
S-1-propenil cisteína	0.5	6.7	8.1	6.5	4.4
S-alil mercaptocisteína (SAMC)	0.01	0.6	1.2	1.7	1.9
Cistina	0.07	0.5	0.8	0.9	1.2
Total de los principales compuestos sulfurados	48	34	26	23	21
Ácido glutámico	1.1	9.7	14.2	15.8	16.2
Arginina	25	27	28	30	33
Polvo de ajo en 5% de ácido acético					
Alina	15.3	13.3	12.2	10.4	8.1
Alicina	0	0	0	0	0
γ -glutamyl-S-alil cisteína	11.9	11.1	10.4	8.2	5.9
γ -glutamyl-S-1-propenil cisteína	8.1	6.4	3.6	0.7	0.2
S-alil cisteína (SAC)	0.3	0.5	0.6	1.2	1.7
S-1-propenil cisteína	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2

* Los dientes de ajo son cortados en pequeñas piezas (2 x 2 x 1 mm) y colocados en una solución de etanol al 20% (12 mL/g) en un recipiente cerrado y almacenado a temperatura ambiente, con muestras recolectadas en los tiempos indicados. Se encontraron resultados muy similares en 3 mL/g y cuando se utilizó agua solamente. El polvo de ajo comercial fue conservado en almacenamiento en 5% de ácido acético en 36 mL/g. El valor de tiempo cero fue determinado después de 24 horas (3,53).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Los principales cambios observados en la preparación del EAE (dilución con etanol al 20%) son:

- La pérdida inicial de **alína** a la formación de **tiosulfínatos**.
- La completa pérdida de tiosulfínatos después de 3 meses (convertidos a **alilsulfuros** volátiles los cuales se evaporan casi completamente).
- La hidrólisis completa de las γ -glutamil cisteínas a las cantidades teóricas de SAC, S-1-propenil cisteína (el principal compuesto sulfurado presente después de 3 meses) y ácido glutámico.

También hay sustanciales incrementos en **cistina** (Tabla 8) y **S-ally mercaptocisteína** (probablemente debido a la reacción de la alicina con los derivados proteínicos de cisteína). El contenido de **SAC** permanece constante después de 3 meses, y la S-1-propenil cisteína (**SPC**) prácticamente no sufre cambios (3).

Cuando el polvo de ajo es mantenido en 5% de ácido acético (simulando dientes enteros de ajo en vinagre, se obtuvieron resultados similares en productos comerciales), no se forman los tiosulfínatos porque el pH es ácido (3.5) y en estas condiciones se inhibe la alinasa. El medio ácido también disminuye lentamente la hidrólisis de las γ -glutamil cisteínas, lo que ocasiona una disminución en la formación de las S-alquenil cisteínas, particularmente en los compuestos S-1-propenilos, donde solo un 2% y un 42% de lo esperado para S-1-propenil cisteína y SAC, respectivamente se encontraron a los 24 meses (3).

Durante la preparación de los alimentos que contienen ajo, se forman sabores adicionales, que resultan de la **ruptura térmica** de los compuestos iniciales producidos enzimáticamente. Y aplicando calor, algunos compuestos pueden ser perdidos por evaporación. Además si sobrecalentamos en un medio acuoso se obtienen productos de hidrólisis. Si los productos de esta ruptura son inestables, se transformarán en otros compuestos que pueden formar parte del aroma y también para el sabor, sin embargo, dichas sustancias tienen bajo poder saborizante. En la **tabla 8** se muestran los cambios que sufren los compuestos de ajo durante el envejecimiento.

Ya que la **alícina** (y otros tiosulfínatos) es muy auto reactiva y su vida media en agua a temperatura ambiente es de alrededor de 30 días; sufre **hidrólisis** para formar **dialil polisulfuros**. Para un óptimo almacenamiento, la alicina debe diluirse con solución acuosa de ácido cítrico (1 mM) o simplemente con agua puede ser congelada (-20 a -

70 °C). Si el ajo es sujeto a una destilación por arrastre de vapor, una pequeña cantidad de "aceite de ajo destilado" es recolectado; este aceite consiste ante todo de dialil polisulfuros y tienen un olor semejante al del ajo, diferente del aroma del ajo fresco característico de la alicina. El aceite destilado de ajo es algunas veces usado como sustituto del ajo fresco en las comidas y es el principal ingrediente de un suplemento líquido llamado "aceite de ajo". Bajo condiciones más suaves, especialmente en presencia de aceites comestibles, la alicina es transformada en ajoene y ditinas. El **ajoene** y las **ditinas** tienen **actividad antitrombótica**, y son algunos de los compuestos responsables de la inhibición de la formación de coágulos en la sangre (17).

Ya que el ajo se consume más frecuentemente **cocinado** que **crudo**, el efecto del cocimiento en los sabores del ajo, sus productos de descomposición y sus respectivos precursores son objeto de nuevas discusiones. Todas las variedades de ajo tienen un fuerte aroma y sabor cuando son triturados gracias a los compuestos con azufre como ya se mencionó anteriormente.

Por exposición con agua hirviendo, la alicina es convertida a los polisulfuros. Si el ajo es primero picado o triturado y entonces calentado en un recipiente cerrado a 100°C por 20 minutos toda la alicina producida inicialmente y otros tiosulfatos son convertidos en polisulfuros (3).

Cuando aplicamos al ajo temperaturas arriba de los 100°C, la alicina se convierte en el aminoácido cisteína y alcohol arílico y cuando los ajos picados son asados en aceite caliente por 1 minuto, la alicina desaparece y permanecen algunos polisulfuros.

Cuando una mezcla de ajo, agua, aceite y salsa de frijol es calentada, la alicina sobrevive, pero cuando el aceite y la salsa de frijol son omitidos de la mezcla, el mayor contenido de productos sulfurados son polisulfuros; esto nos indica que cuando un aceite comestible es usado en el cocimiento del ajo, la alicina puede sobrevivir considerablemente al calor moderado (18).

En la Fig. 11 se muestran las diferentes transformaciones en composición que sufre el ajo dependiendo del tratamiento al que sea sometido (55).

3.10. Composición de los productos comerciales de ajo.

En la Tabla 9, se muestran 20 de los productos de ajo comercializados en la ciudad de México. De acuerdo a la búsqueda realizada en diferentes tiendas de la Ciudad de México, solo 4 de lo 20 productos encontrados contienen solo ajo, en los demás casos éste se encuentra mezclado con otros componentes que pueden poseer propiedades similares a las de este componente, como es el caso de algunas vitaminas, por lo cual al evaluar la capacidad antioxidante de dicha mezcla no podríamos asegurar que el efecto sea producido solo por el compuesto o preparación de ajo presente.

Tabla 9. Productos comerciales con ajo distribuidos en México.

NOMBRE COMERCIAL	PRESENTACIÓN Y DOSIS	TIPO DE PREPARACIÓN DE AJO	OTROS ADITIVOS	LABORATORIOS	COSTO
AJO EN POLVO					
Cirkulin	Grageas 66 mg	Ajo deshidratado		Farmasa Schwabe S.A. de C.V. (Alemania)	\$80.00
Vita ajo con lecitina	Grageas 500 mg	Ajo deshidratado	Lecitina de soya	Mexinatura S.A. de C.V.	\$53.00
Vita ajo con lecitina	Grageas 300 mg	Ajo deshidratado	Lecitina de soya	Mexinatura S.A. de C.V.	\$63.00
Ajo deshidratado	Cápsulas 400 mg	Ajo deshidratado		Centro Botánico Azteca S.A. de C.V.	
GINKGO BILOBA Con ajo y lecitina de soya	Grageas 900 mg	Ajo deshidratado	Ginkgo Biloba Lecitina de soya	Micrometrix S.A. de C.V. Abastecedora de productos naturales S.A. de C.V.	\$98.00
Vita ajo	Cápsulas 300 mg	Polvo de ajo deshidratado		Mexinatura S.A. de C.V.	\$43.00
Arkocápsulas	Cápsulas 330 mg	Bulbo de ajo micronizado		Arkopharm S.A. (Francia)	\$85.00
Ajo	Grageas 100 mg	Polvo de ajo	Perejil y sacarosa	Nutrisa S.A. de C.V.	\$24.00
AJO CON PEREJIL	Grageas 950 mg	Polvo de ajo	Perejil	Plantas M. Anáhuac S.A. de C.V.	\$28.00
Garlicina	Grageas 750 mg	Polvo de ajo	Lecitina de soya	Tecno Botánica de México S.A. de C.V.	\$38.00
AJO-BILOBA	Grageas con recubrimiento entérico 250 mg	Polvo de ajo	Ginkgo Biloba Lecitina de soya	Naturales de California	\$31.00
Grajofort	Grageas	Polvo de ajo	Perejil	Golden Harvest, S.A. de C.V.	\$18.00

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

NOMBRE COMERCIAL	PRESENTACIÓN Y DOSIS	TIPO DE PREPARACIÓN DE AJO	OTROS ADITIVOS	LABORATORIOS	COSTO
Grajofort L	Grageas	Polvo de ajo	Perejil Lecitina de soya	Golden Harnest, S.A. de C.V.	\$18.00
EXTRACTO DE AJO					
Garlivit	Tabletas 1600 µg	Extracto de ajo (equivalente 1600 µg de alicina)	Vitamina B ₁ y vitamina B ₁₂	Modern Research de México S.A. de C.V.	\$29.00
Ajovit Plus	Perlas 495 mg	Extracto de ajo deodorizado en polvo (equivalente a 310 mg de ajo fresco)	Aceite de soya, aceite vegetal, cera de abeja y lecitina de soya	Gelcaps S.A. de C.V.	\$31.00
Ajo Vigorysa	cápsulas	Extracto oleoso de ajo (2 mg equivalente a 500 mg de bulbo fresco de ajo)	Aceite vegetal 298 mg	Laboratorios Goñi's de R.L. de C.V.	\$30.00
AJO ULTRA	Perlas 500 mg	Extracto de ajo deodorizado	Aceite vegetal Lecitina de soya Cera de abeja	Gelcaps S.A. de C.V. Abastecedora de productos naturales S.A. de C.V.	\$48.00
NATURATE Ajo San	Cápsulas 400 mg	Extracto de ajo	Aceite de cártamo Vitamina E	Herbario México S.A. de C.V.	\$25.00
ACEITE DE AJO					
Ajovit Con perejil	Cápsulas 500 mg	Aceite de ajo (equivalente a 325 mg de bulbo fresco de ajo)	Perejil	Gelcaps S.A. de C.V.	\$27.00
Ajovit	Cápsulas 0.495 g	Aceite de ajo (equivalente a 325 mg de bulbos frescos de ajo)	Aceite de soya y oleoresina de Papikra	Gelcaps S.A. de C.V.	\$25.00

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

En la Fig. 12 se muestra algunos productos comerciales que contienen como principal componente el ajo.



Fig.12 Productos comerciales que contienen como principal componente el ajo.

En la tabla 10 se compara la composición de algunas de los productos comerciales de ajo en USA. Como se puede ver el rango de concentración de los compuestos individuales es muy amplio, lo que indica que hay una gran variación en la composición de los suplementos con ajo. Esta variación es menor en productos estandarizados que en productos no estandarizados, en productos con polvo de ajo que en aquellos que contienen aceite, lo que refleja quizá diferencias en las prácticas de manufactura o la complejidad del extracto de que se trata, e indica la necesidad de etiquetar en el producto su composición exacta. El análisis también demostró que en la mayoría de los casos los productos que especifican su contenido, efectivamente cumplen con lo marcado en la etiqueta (3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 10. Principales compuestos sulfurados del ajo entero, del ajo en vinagre (conserva), del polvo de ajo y de suplementos de ajo^a (3).

PRODUCTO	CONSTITUYENTE Y CANTIDAD (mg/g producto)	COMPUESTOS DERIVADOS DE ALINA ^b
Dientes de ajo	Alina (10:6-14), γ-glutamil cisteinas ^c (10:5-15) rendimiento de alicina(3.5:2.5-5.1)	4.6(3.5-8)
Dientes en conserva (AV)	Alina(3.4:2.0-4.2), γ-glutamil cisteinas (3.3:3-4)	0.0
Polvos ^d para condimento	Alina (11.5:10-17), γ-glutamil cisteinas (26:12-35), rendimiento de alicina(4.5:3-7)	7.3 (4-11)
Polvos ^d para tabletas	Alina (21:7-29), γ-glutamil cisteinas(29:14-40) rendimiento de alicina(8.5:3-11)	12.5(4-17)
Polvos de tabletas (estandarizado)	Alina (13:7-24), γ-glutamil cisteinas (22:7-32), rendimiento de alicina (4.2:1.3-8.9)	5.6 (1.4-12)
Polvos de tabletas no estandarizado	Alina (7:0.4-14), γ-glutamil cisteinas (12:2-31) Rendimiento de alicina (1.9:0.1-5.7)	2.6 (0.1-8)
Cápsulas de aceite por destilación por arrastre de vapor	DADS (1.0:0.05-2.8), DATS (0.7:0.04-2.0), Allimetritisulfuro (0.6:0.03-1.7)	3.8 (0.2-11)
Cápsulas de aceite obtenido por maceración	Vinilditinas (1.1: 0.1-4.7), Ajoene (0.2:0.02-1.1), DATS (0.11: 0.02-0.45)	1.5 (0.4-6.0)
Tabletas/cápsulas con EAE	Alina (0.3: 0.2-0.4), γ-glutamil cisteinas (0.34:0.2-0.5), γ-glutamil-S-alil cisteina (0.25:0.1-0.4), S-alil cisteina (0.6: 0.5-0.7) S-alil mercaptocisteina (0.15: 0.1-0.2)	0.15 (0.1-0.2)

^a los valores que están reportados en negritas son los que se encuentran principalmente para varias marcas, o lotes de una sola marca (extracto envejecido) de cada tipo de producto (2).

^b los compuestos derivados de alina incluyen alicina y otros aliltiosulfatos (después de la adición de agua), alilisulfuros, vinilditinas, ajoene, y S-alil mercaptocisteina.

^c los valores de γ-glutamil cisteinas para todos los productos es la suma de los compuestos S-alil y S-trans-1-propenil.

^d al comparar los polvos y dientes de ajo, dividir los polvos entre 3 ya que los dientes contienen 65% de agua.

3.10.1 Productos con polvo de ajo.

El polvo de ajo es el producto que más se asemeja en su composición a los dientes de ajo fresco, ya que solo ha sido deshidratado a bajas temperaturas (50-60°C) y en las cuales solo hay una pérdida de 5-15% de rendimiento de alicina (2,3); sin embargo, la cantidad de alina presente puede variar considerablemente dependiendo del procedimiento de secado al que hayan sido sometidos los dientes de ajo. Esto es, dependiendo del método usado en el picado y manejo de los dientes de ajo; las rebanadas pueden secarse rápidamente si son muy delgadas, pero entre más fino es el

rebanado, la alina se pierde. De aquí que los polvos de condimento tienen un contenido de alina (o rendimiento de alicina) que está comúnmente cerca de 50% más que el de los polvos usados para realizar la calidad de estandarización de alina/alicina (2,3). De 29 marcas de suplemento en polvo de ajo comparadas recientemente en Estados Unidos, solo 11 declaran su rendimiento de alicina. Este rendimiento de alicina en los productos con polvo de ajo es estable, es decir, en un promedio de 5 años se pierde aproximadamente el 36% de alicina (3).

Un aspecto importante en la calidad de los productos con polvo de ajo es la capacidad para que se forme alicina después del consumo, dado que la alinasa es rápida e irreversiblemente inhibida por el ambiente ácido comúnmente encontrado en el estómago (pH 1.5-3.0) (35,41,56,57). Cuando los dientes de ajo son consumidos, la formación de alicina es casi espontánea, aproximadamente después de 6 segundos de ser masticado el ajo, pero esto debe ser antes de alcanzar el estómago. Por lo tanto, es esencial que los productos con polvo de ajo sean protegidos con algún protector o capa entérica. Lo que también además ayuda a disminuir el olor del aliento porque retarda la formación y liberación de cualquier aliilsulfuro hasta que la tableta pasa por el estómago. Alrededor de 2/3 de los Estados Unidos demandan suplementos con polvo de ajo con algún tipo de recubrimiento entérico resistente al ácido (3).

La efectividad de los productos que contienen alicina en el cuerpo es mejor estimada como el "rendimiento efectivo de alicina", el cual está definido como la cantidad de alicina formada bajo condiciones gastrointestinales, o en términos más específicos como:

La cantidad de alicina formada (o alina consumida) después de que los productos han sido agitados a 37°C en un medio de fluidos gástricos simulados (pH 1.5) por 1 h, seguido de la adición de fluidos intestinales (pH 7.5) y continuando con la agitación por 2 h (3).

De 20 productos probados en EUA se encontró que, 8 marcas tenían un rendimiento de alicina mayor de 1%, mientras que solo 6 tuvieron rendimiento efectivo de más de 70%. El rendimiento efectivo de alicina debería ser el estándar de calidad para los suplementos de polvo de ajo (2,3).

3.10.2 Productos con aceite de ajo.

A diferencia de la mayoría de los aceites encontrados en las plantas, el aceite de ajo no se encuentra presente como tal en los dientes de ajo. Es el resultado de la conversión de los **tiosulfatos solubles en agua** de los dientes de ajo triturados a **sulfuros**

solubles en aceites, por el uso de **vapor o bien por maceración**, por lo que erróneamente se le ha llamado aceite esencial ya que son estrictamente productos de transformación debido a los tratamientos o condiciones a que es sometido el ajo.

La destilación por arrastre de vapor de aceites de las plantas ha sido utilizada desde hace 150 años y es muy común, mientras que los aceites obtenidos por maceración son poco conocidos en algunas zonas de Europa, y también en Estados Unidos (solo hay 3 marcas conocidas) (2,3).

Los productos que contienen aceite de ajo, se encuentran muy diluidos en otros aceites naturales como aceite vegetal, para conseguir una concentración final de compuestos organosulfurados equivalente a la cantidad encontrada por diente de ajo. Este aceite se ha obtenido a nivel industrial la mayor parte por destilación por arrastre con vapor, y en menor proporción por procesos de maceración, un ejemplo de esto es el producto Ajo Vigorysa[®], el cual contiene 2 mg de aceite de ajo equivalente a 500 mg de bulbos de ajos frescos diluido con 298 mg de aceite vegetal (3). Actualmente por destilación no se obtienen cantidades específicas de alilsulfuros, pero 8 de 22 marcas en Estados Unidos reportan una cantidad específica de aceite de ajo puro (3). De 11 marcas de aceites obtenidos por maceración, solo uno reporta su composición exacta. Los aceites, productos de destilación, son estables por lo menos 5 años, mientras que los aceites macerados o envejecidos tienen una estabilidad de alrededor de 18 meses (2,3).

Los principales compuestos son: los tiosulfatos derivados principalmente de alina (95%), de aquí que la calidad de los aceite de ajo representa mucho de la actividad farmacológica del ajo triturado y es útil en las evidencias mostradas propias de la alicina. Hay un registro de la composición del aceite de ajo utilizado en un estudio, en el cual obtuvieron por destilación por arrastre con vapor el aceite de ajo, donde las proporciones reportadas de los componentes fueron las siguientes: DAS 10%, DADS 40%, y DATS 35% (58).

3.10.3 Extracto envejecido de dientes de ajo en vinagre (AV).

Los extractos envejecidos representan un intento exitoso para eliminar el olor característico del ajo (de los tiosulfatos). Sin embargo muchos de los compuestos sulfurados del ajo se pierden en el proceso. Sus métodos de preparación y los cambios químicos que toman lugar durante el periodo de envejecimiento se describieron anteriormente. Son vendidos tanto en forma seca, como líquida conteniendo 10% de

etanol. Aunque los cambios más significativos ocurren con la mayor parte de los compuestos organosulfurados durante este periodo, la cantidad total de S-alquienil cisteínas (SAC, SAMC y SPC) aumenta considerablemente. Es así, como los productos comerciales de EAE debieran especificar su contenido de **S-allyl cisteína**.

Poner en vinagre los ajos inactiva a la enzima alinasa y previene la formación de tiosulfatinos, es decir, del olor, solo con un pequeño consumo del compuesto original sulfurado (alina). Por lo tanto, los dientes comerciales en vinagre tienen un contenido total de **SAC** de cerca de 22 μ moles/g en peso seco. La mayor parte de lo perdido se debe a la difusión dentro de la solución de vinagre. El método más corto y simple para eliminar el olor del ajo al elaborar un producto, es en el cual se pierda o haya poca pérdida de compuestos sulfurados y puede ser alcanzando el cocimiento de todos los dientes ya sea en vapor, horno de microondas, o hirviendo para inactivar la alinasa antes del consumo o antes del secado y entonces pulverizarlo. Sin embargo los productos obtenidos con la alinasa inactiva, producen poco olor, y sobre todo no olvidemos que no poseerán algunos de los efectos benéficos del ajo fresco debido a la falta del rendimiento de los tiosulfatinos obtenidos (3).

3.11. Absorción y metabolismo de los compuestos organosulfurados del ajo

¿Qué le sucede al sabor del ajo y a sus constituyentes después de que es ingerido?

Actualmente se tiene muy poca información acerca de la absorción, metabolismo y excreción de los compuestos sulfurados del ajo, lo que impide determinar el mecanismo de acción de dichos compuestos en el organismo. Por ejemplo, se conocen las formas metabólicas de la alicina responsable de su efecto terapéutico, y se han realizado estudios *in vitro* para determinar el posible mecanismo de acción, ya que esto es importante y ha limitado en gran medida su uso. Además no se han detectado los marcadores de los compuestos sulfurados del ajo en la sangre humana.

Sin embargo, se sabe que la **alicina se absorbe muy bien**, indicado esto por un **olor persistente en el aliento, piel o líquido amniótico** (59) en las personas después del consumo del ajo crudo o fresco. En un estudio en animales a los cuales se les administró oralmente ³⁵S-alicina se encontró que se absorbió el 79% de este compuesto en aproximadamente 30-60 min después del consumo y que se excretó en

la orina el 65% de los metabolitos de la alicina dentro de 72 h (60). Además la actividad antitrombótica del ajo crudo o fresco (debida a la alicina) es la misma en ratas si se administra intraperitoneal u oralmente (61). Adicionalmente se demostró la absorción sustancial de alicina en personas después la ingestión oral del compuesto puro lo cual se asoció con un incremento significativo en el catabolismo global de los triglicéridos.

El destino metabólico de la alicina en el cuerpo no se conoce, por lo que en la actualidad es un campo importantísimo de investigación.

En la Fig. 13 se muestran las posibles vías de metabolismo de los principales compuestos del ajo en el cuerpo humano.

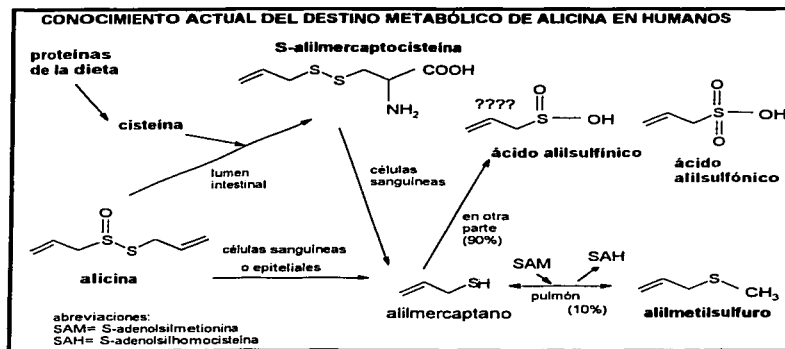


Fig. 13. Conocimiento actual del destino metabólico de alicina en humanos.

Ni la alicina ni sus productos de transformación como los dialilsulfuros, vinilditinas y el ajoene, se encuentran en la sangre y la orina, tampoco puede ser detectado el olor en las heces después de consumir grandes cantidades de ajo (debajo de 25 g), o de alicina pura (60 mg) (62), indicando que es rápidamente metabolizada a nuevos compuestos; sin embargo, los metabolitos de **alicina** en el organismo no se han identificado todavía. La excepción a esta afirmación es la presencia de **alli metil sulfuros** (AMS) y de **DADS** en cantidades mucho menores en el aliento después del consumo de ajo (43,46). Lo que confirma que estos sulfuros son originados de los

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

tiosulfatos, con un consumo del 10% de alicina, más que de otros **S-alil** compuestos en el ajo y demostrando que el grupo metilo viene del organismo, probablemente como producto de la reacción entre **alil mercaptano** y **S-adenosilmetionina**. En este estudio (3) también se encontró que cuando el ajo es cocinado en microondas no se produce AMS en el aliento, lo que demuestra que el grupo **alilo** puede venir solo de los **alil tiosulfatos** y no de la **alina** o **γ -glutamyl-S-alil cisteína**. En sangre humana entera, la **alicina** es metabolizada rápidamente por las células sanguíneas a **alil mercaptano** (alil-SH) (11,62). En la tabla 11 se muestra el destino final de la alicina y de sus derivados en sangre.

Tabla 11. Destino final de la alicina y de sus compuestos derivados en sangre^a (3).

Compuesto (0.5 mM)	Vida media en sangre (minutos)	Productos de reacción (moles / mol de compuesto)
Alicina	<1	Alil-SH (1.6)
Ajoene	1	Alil-SH(0.8)
S-alil mercaptocisteína	3	Alil-SH(0.9)
Dialitrisulfuro	4	Alil-SH
Dialitisulfuro	60	Alil-SH
Dialilsulfuro	NR	
1,2-vinilditina	15	Desconocido
1,3-vinilditina	NR	
Alil-SH	NR	
Alina	NR	

^a en sangre entera fresca guardada a 37°C (11,62,63). NR (<10 reduce en 2 h).

Esto también parece ocurrir en las células epiteliales de la garganta, ya que el consumo del ajo triturado resulta casi de inmediato, en 15 s, en presencia de alil-SH en el aliento (43,44). Sin embargo, es probable que el alil-SH no sea el único metabolito de la alicina, ya que este es un compuesto altamente oloroso y no se ha encontrado en determinaciones cuantitativas en sangre, heces y orina ya que después del consumo oral de 150 mg de alil-SH, solo se detectó en aliento, por otros detectores mucho más sensibles que el sentido del olfato. Buenos candidatos de los metabolitos activos de la **alicina** después de la formación de alil-mercaptanos pueden ser: el **ácido alilsulfínico** (ácido 2-propensulfínico) o **ácido alilsulfónico (2-propensulfónico)**. Esta propuesta se basa en el hecho de que la **cisteína**, el cual tiene un grupo tiol, es metabolizada en el cuerpo a β -sulfiniipiruvato (un ácido sulfínico), y menores cantidades de taurina (un ácido sulfónico). Además, se ha demostrado en ratas tratadas con ³⁵S-**alicina** que la mayoría de los metabolitos marcados son altamente polares, indicando que se han oxidado (60), y que la alicina se metaboliza a los dialil sulfuros los cuales se

transforman completamente en las ratas a sus productos oxigenados, el dialil sulfóxido (**DASO**) y el dialil sulfona (**DASO₂**) (64).

Muchos de los productos de transformación de la **alicina** están presentes en los aceites comerciales del ajo, y también son metabolizados inicialmente a **alli-SH** (ver la tabla anterior). Esto es una observación importante porque indica que los estudios farmacológicos con aceite de ajo, el cual contiene casi exclusivamente compuestos derivados de alicina, están directamente implicados en los efectos que la alicina tiene en el organismo.

La **alina** proveniente del ajo cocinado es absorbida y excretada rápidamente y puede ser parcialmente metabolizada a DADS en hígado de animales experimentales (53,60,65), pero esto no pasa en humanos, porque el consumo abundante de alina no resulta en la presencia de alilsulfuros en el aliento. Y ya que las γ -glutamil-S-alquencilisteínas son estructuralmente similares al glutatión, y son probablemente absorbidas intactas y después hidrolizadas en el riñón por la γ -glutamil transpeptidasa a SAC y S-1-propenil cisteína. Se han encontrado metabolitos de estos compuestos en orina humana después del consumo de ajo e incluyen, entre otros (54,66): la N-acetil-S-alil cisteína, la N-acetil-S-(2-carboxipropil) cisteína, la N-acetil cisteína, y el ácido hexahidrohipúrico. La cantidad de N-acetil-S-alil cisteína encontrada en la orina recolectada durante 24 h representa 25 moles% (3) de la γ -glutamil-S-alil cisteína consumida (67).

En un estudio sobre el destino metabólico de grandes dosis de SAC en tres diferentes especies de animales (ratas, ratones y perros) se demostró que es absorbida rápidamente y en concentraciones iniciales altas en varios tejidos, especialmente en riñón y en menor proporción en sangre (66). Su vida media en el plasma sanguíneo es de 0.8-10.3 h y la distribución urinaria de los metabolitos varía enormemente entre los tipos de animales. El estudio demostró que la biodisponibilidad de SAC disminuye proporcionalmente con la dosis, se reporta un 98% con una dosis de 50 mg/Kg de peso corporal, 77% con 25 mg/Kg y 64% con 12 mg/Kg. La biodisponibilidad de SAC es muy pequeña, ya que si se consumen 5 g de ajo no se obtienen cantidades de SAC mayores a 0.05 mg/Kg (2).

3.12. Resumen de la evidencia de los compuestos activos del ajo.

Hasta aquí hemos visto, que los tiosulfatos son los principales compuestos del ajo responsables de proveer las diferentes actividades terapéuticas, en los niveles

normales del consumo de ajo (2-4 g/día). La alicina es el más importante de los tiosulfínatos y se forman al cortar y/o triturar un diente de ajo y se asocia más con las actividades antioxidantes, antitrombóticas y antimicrobianas que otros tiosulfínatos (23,62). Existen fuertes evidencias que indican que los tiosulfínatos son responsables de los efectos antimicrobianos e hipolipidémico/hipocolésterolémiantes del ajo, y también parecen ser los responsables de los efectos antioxidantes e hipoglicémicos; además de los efectos anticancerígenos y de estimulación inmune, pero no hay evidencia de que posea efecto hipotensivo (tabla 12).

Tabla 12. Resumen de los principales compuestos esenciales de los dientes de ajo y sus efectos farmacológicos en los niveles normales de consumo.

EFECTO	BUENAS EVIDENCIAS	ALGUNAS EVIDENCIAS
Antimicrobiano	Alicina/ tiosulfínatos	
Hipolipidémico	Alicina/ tiosulfínatos	
Hipotensivo	Desconocido (no tiosulfínatos)	γ -glutamil cisteínas,
Antitrombótico	Alicina/ tiosulfínatos	fructanos
Fibrinólisis	Alicina/ tiosulfínatos	Cicloalina
Antioxidante	Alicina/ tiosulfínatos	
Anticancerígeno	Desconocido y tiosulfínatos	γ -glutamil cisteínas
Efectos en el sistema inmune	Desconocido y tiosulfínatos	

Esto no quiere decir que todos los efectos del ajo se deban solamente a los tiosulfínatos, ya que existen otros compuestos presentes en el ajo, que no tienen una actividad significativa en los niveles encontrados en los dientes de ajo y en el ajo picado. Así mismo, en los productos de ajo, solo los compuestos derivados de alicina y de alicina tienen la mayor actividad reportada. Además, la SAC, la adenosina, las saponinas y la porción proteica, posiblemente tengan alguna actividad terapéutica, pero los niveles en los que se encuentran normalmente en los dientes de ajo, son muy pequeños para tener una actividad importante. En el caso de las γ -glutamil cisteínas y los fructanos, son mucho más abundantes y son buenos candidatos para realizar futuras investigaciones aunque solo se han realizado algunos estudios *in vitro*. En la actualidad se están realizando más estudios farmacológicos con fracciones de ajo de composición conocida en diferentes áreas, los cuales en su mayoría están conducidos hacia los efectos anticancerígenos y sobre la actividad en el sistema inmune, así como del efecto cardioprotector de algunos compuestos, investigaciones que quizá podrían conducir a la identificación de compuestos aun no conocidos (2,3).

4. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS COMPUESTOS Y/O PREPARACIONES DEL AJO.

4.1. Especies reactivas de oxígeno.

El oxígeno es reducido de manera completa a agua por el complejo de la citocromo oxidasa, esta reducción es conocida como tetravalente por el hecho de que la molécula de oxígeno acepta 4 electrones y no se liberan especies reducidas incompletamente de dicho complejo enzimático (Fig.14). Alrededor del 95% del oxígeno utilizado por los organismos aerobios es reducido completamente por vía tetravalente. Menos del 5% del oxígeno es reducido incompletamente por la vía univalente, ya que acepta de 1 a 3 electrones. Las especies generadas por medio de esta vía se conocen como especies reactivas de oxígeno (EROs) (68,69). Entre éstas se encuentran: el radical o anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), además del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que, aunque no es un radical libre en sí, es importante ya que es el principal precursor del radical hidroxilo, el radical libre más tóxico y reactivo (69-71).

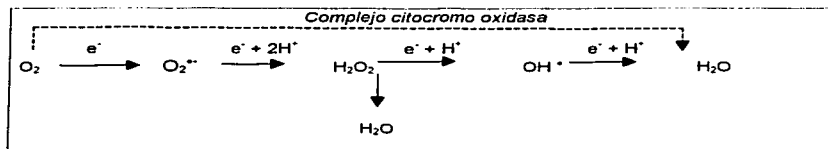


Fig. 14 Vías univalente y tetravalente para la reducción del oxígeno (70).

Los radicales libres (RL) en condiciones específicas y a concentraciones determinadas, son dañinos para las células y los tejidos ya que oxidan diversas moléculas biológicas como las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos (Fig 15) (71). Sin embargo también cumplen con funciones biológicas importantes como la fagocitosis (72), oxidación de xenobióticos, o bien en las plantas participan en procesos de maduración, envejecimiento y la respuesta al daño tisular (68).

Es por ello que los organismos cuentan con un sistema enzimático antioxidante, a través del cual son capaces de metabolizar las especies reactivas del oxígeno. Cuando

se rompe el equilibrio entre las EROs y el sistema de defensa antioxidante, sobreviene la disfunción local o generalizada comúnmente denominada **ESTRÉS OXIDATIVO**. Existe una variedad de condiciones patológicas en las que se cree que están involucradas las EROs, como por ejemplo: cáncer, artritis reumatoide, enfermedades respiratorias como fibrosis pulmonar, aterosclerosis y enfermedades mediadas por complejos inmunes, entre otras (71). En la Fig. 15 se muestra la respuesta al daño oxidativo causado por las EROs.

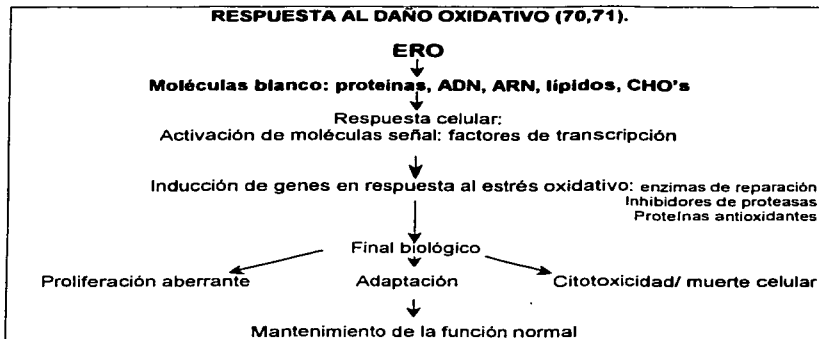


Fig. 15. Esquema de la respuesta al daño oxidativo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4.1.1 Formación de las especies reactivas de oxígeno.

Las principales especies reactivas de oxígeno son:

4.1.1.1 Anión superóxido (O₂⁻).

Es la primera especie reactiva de oxígeno formada durante la reducción univalente del oxígeno (68). Se forma cuando el oxígeno molecular recibe un solo electrón (Tabla 13). Bajo condiciones normales el O₂⁻, es producido en bajas concentraciones por el metabolismo celular, por autooxidantes de hidroquinonas, leucoflavinas, catecolaminas, tioles, tetrahidopterinas y hemoglobina; también los citocromos P₄₅₀ y b5 localizados en el retículo endoplásmico generan O₂⁻, por autooxidación, ambos citocromos presentan una gran actividad en presencia de NADPH (citocromo P₄₅₀) o NADH (b5). En todos los casos el producto primario formado es O₂⁻. Numerosas enzimas localizadas en el

citósol, mitocondria y peroxisomas, así como en la membrana plasmática, generan ERO durante su ciclo catalítico. La xantina oxidasa, que está presente en el riñón, genera $O_2^{\cdot-}$ durante el catabolismo de las bases púricas. La mayor parte de la ERO producidas por la mitocondria provienen de la cadena de transporte de electrones localizadas en el interior de la membrana. Los peroxisomas contienen altas concentraciones de oxidasas que pueden ser fuente de ERO (73), entre otros. El anión superóxido también se origina durante la descarga respiratoria de los procesos fagocíticos de las células de defensa inmunológica, a través de un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa (70).

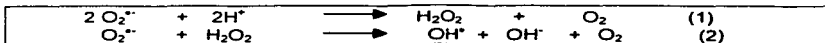
Tabla 13. Fuentes de anión superóxido en los organismos vivos (69).

Fuente endógena	Transporte de electrones en la mitocondria, cloroplastos, y retículo endoplásmico
	Enzimas oxidantes: xantina oxidasa, galactosa oxidasa, monoamino oxidasa, triptofano oxigenasa, ciclooxigenasa y lipooxidasa.
Fuente exógena	Células fagocíticas: neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, células endoteliales.
	Auto oxidación de catecolaminas, metabolismo del ion hierro, tioles, hemoglobina.
	Oxidación de compuestos redox: paraquat, antraciclinas, aloxano
	Oxidación metabólica de paracetamol, tetracloruro de carbono, etc. Radiación ionizante, luz UV. Quemaduras y otros traumas

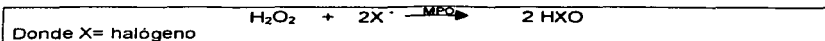
4.1.1.2 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Se genera por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) sobre el anión $O_2^{\cdot-}$. En solución acuosa, el $O_2^{\cdot-}$ dismuta de manera espontánea (74) generando H_2O_2 y oxígeno singulete.

Estrictamente el peróxido de hidrógeno no es un radical libre porque no posee electrones desapareados, sin embargo al participar en la reacción de Haber-Weiss (reacciones 1 y 2), genera radicales hidroxilo o interactúa con halógenos y el sistema mieloperoxidasas para producir ácidos como el ácido hipocloroso, ácido hipobromoso, etc. (reacción 3) (75,76).



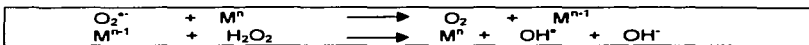
Producción de ácidos derivados de halógenos por el sistema de mieloperoxidasas (MPO)



4.1.1.3 Radical hidroxilo (OH[•]).

Se genera por la ruptura del enlace oxígeno-oxígeno del H₂O₂ lo cual da como resultado 2 radicales hidroxilo, también puede formarse por la reacción de Haber-Weiss o por la reacción de Fenton:

Reacción de Fenton:



Donde M es un metal de transición como Fe³⁺ o Cu²⁺.

Por otra parte el anión superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico generando el peroxinitrito (ONOO[•]), el cual al hidrolizarse se escinde en una molécula de radical hidroxilo y una de dióxido de nitrógeno (77).

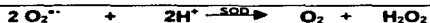
Vía de generación del radical hidroxilo a través del peroxinitrito



4.2 Enzimas antioxidantes.

4.2.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) (óxido reductasa EC 1.15.1.1).

Las SOD son metaloenzimas que catalizan la conversión del O₂^{•-} para dar oxígeno molecular y H₂O₂. Fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969 (78):



En las células eucarióticas existen tres isoformas de SOD. Todas son producto de genes nucleares diferentes y se sintetizan en los ribosomas citoplásmicos (79). Dos de estas isoformas contienen en sus sitio activo Cu y Zn, y la tercera contiene Mn. Una de las isoformas de Cu y Zn se localiza principalmente en el citosol aunque también se encuentra en los lisosomas, núcleo y en menor cantidad en peroxisomas y espacio intermembranal mitocondrial (80), tiene estructura dimérica con un peso de 17 kDa por subunidad (81,82). La otra isoforma de Cu y Zn es extracelular y fue descrita por Marklund en 1982; su peso molecular en el humano es de 135 kDa y tiene estructura tetramérica (83), se localiza en fluidos como el plasma, líquido sinovial y linfa. Se ha sugerido que su sitio de síntesis son las células endoteliales y que cuando está unida a

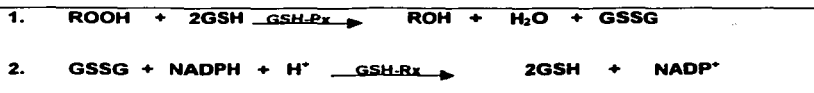
ellas funciona como una cubierta protectora, posee afinidad por la heparina (84) y contribuye de un 0.5-20% de la actividad total de la SOD (83). Esta isoforma en la rata está constituida por 2 subunidades, su peso molecular total es de 85 kDa y al contrario que la forma tetramérica, no posee afinidad por la heparina (84). La tercera isoforma de SOD, también es un tetrámero, contiene un átomo de Mn por subunidad, se localiza en la matriz mitocondrial, y tiene un peso molecular total de 80 kDa (80). En la tabla 14 se muestran la características de la isoformas de SOD.

Tabla 14. Características de las isoformas de SOD (70).

Isoforma	Localización	Estructura	Peso total	molecular
EC Cu-Zn/SOD (rata)	Extracelular	Dímero	85 kDa	
EC Cu-Zn/SOD (humano)	Extracelular	Tetrámero	135kDa	
Cu-Zn/SOD Mn/ SOD	Citosol Matriz mitocondrial	Dímero Tetrámero	34 kDa 80 kDa	

4.2.2 GLUTATION PEROXIDASA (GSH-Px) (glutación: H₂O₂ oxidorreductasa, EC 1.11.1.9).

El H₂O₂, producto de la reacción de la SOD, es transformado a agua por una hidropoxidasa como la GSH-Px, descrita por primera vez por Mills en 1957. Esta enzima contienen un átomo de selenio en su sitio activo y cataliza la descomposición del H₂O₂ o de otros peróxidos orgánicos con la oxidación concomitante del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG), el cual es a su vez reducido a GSH por la glutatión reductasa (GSH-Rx), en presencia de NADPH formando un ciclo redox e impidiendo que se agoten las reservas de GSH (85,86). El NADPH es regenerado a partir de NADP⁺, por la acción de las enzimas: málica, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa.



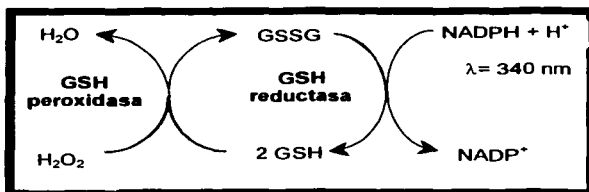
Se conocen la siguientes isoformas de ésta y algunas de sus características son (tabla 15):

- a) **GPx- citosólica: (cGSH-Px):** Es una enzima tetramérica que sólo tiene actividad antioxidante en casos de un incremento de peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos de lípidos, pero muestra baja actividad sobre hidroperóxidos de fosfolípidos y colesterol.
- b) **GSH-Px-extracelular: (piGSH-Px).** Es una enzima glicosilada, se sintetiza en riñón y pulmón, su ARNm se ha encontrado en células de epitelio tubular proximal y en células parietales de la cápsula de Bowman (87). Sin embargo, su función no ha sido bien establecida ya que su sustrato (GSH) está en muy bajas concentraciones (0.3 μM) en el plasma (88,89). Está constituida por 226 residuos de aminoácidos (90).
- c) **GSH-Px gastrointestinal (giGSH-Px).** Se localiza principalmente en el tracto gastrointestinal de los roedores y en el humano también se ha encontrado en el hígado y colon (85,89). Se piensa que tiene un papel de protección en el sistema inmune contra efectos adversos en la ingesta de hidroperóxidos (88).
- d) **GSH-Px de fosfolípidos (EC 1.11.1.12) (PIGSH-Px).** Es una hidroxiperoxidasa de fosfolípidos, está unida a membranas intracelulares y tiene una menor afinidad por GSH, su actividad se encuentra mejor preservada en casos de deficiencia de selenio (91). Se ha reportado que reduce hidroperóxidos de colesterol y al 7β -hidroperóxido de colesterol, uno de los compuestos más citotóxicos de las lipoproteínas estudiadas (92). En todos los casos, con excepción de la **PIGSH-Px** que es un monómero, todas las isoformas de GSH-Px son tetrámeros (93).

Tabla 15. Características de la isoformas de GSH-Px. Todas son productos de genes diferentes (31,36,38).

Isoforma	Localización	Estructura	Peso molecular total kDa
cGSH-Px	Citosol	Tetrámero	84
piGSH-Px	Extracelular	Tetrámero	100
giGSH-Px	Gastrointestinal	Tetrámero	75
PIGSH-Px	Membranas	Monómero	21

En la Fig. 16 Se ilustra el sistema de enzimas acopladas de la GSH-Px.



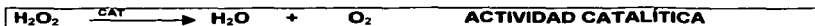
TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Fig. 16. Esquema de las reacciones catalizadas por la GSH peroxidasa y la GSH reductasa

4.2.3 CATALASA (CAT) (EC 1.11.1.6).

La CAT es una hemoproteína tetramérica con un peso de 240 kDa, con 4 ferriprotoporfirinas por molécula (94) y su vida media en la circulación es relativamente corta, de 6-8 minutos (95). Está presente en los peroxisomas y posee una doble función:

- a) Acción catalítica: es la descomposición de H_2O_2 en O_2 y H_2O .



- b) Actividad de peroxidasa: a la oxidación de donadores de protones como metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles, con el consumo de 1 mol de peróxido (96).



En tejidos de mamíferos la CAT está presente en altas concentraciones en hígado y riñón, y en bajos niveles en tejido conectivo (97), en general en las células se encuentra principalmente en los peroxisomas (80%) y mitocondrias, mientras que en los eritrocitos existe en una forma soluble (94). Presenta una heterogeneidad molecular, que puede ser de origen genético, lo cual produce cambios en su conformación (por oxidaciones de grupos SH), que pueden llevarla a la disociación del tetrámero activo, lo que la convierte en un dímero, el cual tiene actividad peroxidativa pero no catalítica (94). Las reacciones catalíticas de esta enzima poseen una k de alrededor de $10^7\ mol/L \cdot seg^{-1}$, mientras que las peroxidativas tienen aproximadamente una k de $10^2 - 10^3\ mol/L \cdot seg^{-1}$. La reacción predominante dependerá de la

concentración del donador de protones, así como de la concentración basal y/o de la producción de H_2O_2 por el sistema (94).

En contraste con el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 , no se conocen enzimas capaces de regular directamente las concentraciones de radicales OH^{\cdot} . A través de las enzimas antioxidantes, los organismos son capaces de eliminar las sustancias precursoras de este radical, antes de que sea formado. Sin embargo, éste radical puede ser neutralizado por la vitamina E o alfa tocoferol, que es un antioxidante excelente, y que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas biológicas donde la protección que le confiere a la membrana es particularmente efectiva (77). La vitamina E y otros antioxidantes fenólicos interrumpen el proceso de lipoperoxidación inhibiendo la etapa de propagación, puesto que reaccionan con los radicales peroxilo generando productos que no son radicales (98). Estos antioxidantes serían adquiridos vía exógena y entre los que podemos encontrar además de la vitamina E y el beta caroteno, algunos vegetales como las crucíferas col y brócoli, y además al ajo.

4.3 ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO.

Con respecto a las especies reactivas de nitrógeno, tenemos al óxido nítrico (NO), el cual es un radical gaseoso, relativamente poco reactivo en comparación con las especies antes vistas, puede dar lugar a otras especies químicas altamente reactivas como el ion nitroso (NO^+) y el radical nitroxilo (NO^{\cdot}), a través de mecanismos redox fisiológicos. Estas especies (tabla 16) pueden reaccionar y modificar diversas moléculas biológicas (99).

Tabla 16. Interacciones bioquímicas del NO y de sus propiedades relacionadas (68,99).

Especies de NO	Reactantes	Productos
NO	Metales de transición, O_2 , $O_2^{\cdot-}$	Hemoglobina (Fe^{2+})-NO, NO_2^- , ONOO $^-$
NO^+	Aminas, tioles aromáticos	Nitrosaminas, proteína (cys)S-NO, Ar-NO
NO^{\cdot}	Dimerización, tioles, metales	N_2O , R-S-NOH, RS-SR, hemoglobina (Fe^{3+})-NO
ONOOH, ONOO $^-$	DNA, tioles, tirosina	Bases diaminadas, R-S-OH, R-S-OOH, proteínas (tyr)-NO $_2$

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

5. EFECTO PROTECTOR DEL AJO EN MODELOS EXPERIMENTALES *in vivo* e *in vitro*

5.1 Efecto antioxidante de los compuestos del ajo.

Ya que los antioxidantes son importantes en el tratamiento de padecimientos como el cáncer y la aterosclerosis, numerosos estudios *in vitro* (44), y 15 en animales y 4 en humanos han sido conducidos con ajo, aceites de ajo con derivados de alicina y alina (2,3). Dichos estudios han demostrado consistentemente buena actividad antioxidante la cual se ha hecho evidente por una disminución de la lipoperoxidación, un incremento del atrapamiento de radicaies libres (disminución del radical •OH) y un incremento en GSH. Un estudio reciente en ratones demostró que el DATS es mucho mas efectivo que el DAS para aumentar el GSH tisular y la actividad de la glutatión-S-transferasa (100). De los 4 estudios (101-104) realizados en humanos hasta ahora (con 600-900 mg de polvo de ajo y con tabletas con alicina/alina estandarizados) solo en 3 (101-103) se han encontrado efectos positivos en la disminución de la oxidación de LDL. Aunque la alicina puede ser un compuesto oxidante en concentraciones suficientes *in vitro*, los resultados de los 12 estudios animales con polvo de ajo con rendimiento de alicina y aceites derivados de alicina indican que la alicina es probablemente responsable para la mayoría de los efectos antioxidantes del ajo *in vivo* a bajas dosis (0.1-0.5 mg/Kg de peso corporal, equivalente a 1.4-8 g de ajo por 70 Kg de peso corporal) mientras otros compuestos (alina, γ -glutamil cisteínas, SAC) parecen tener actividad solo en altas dosis (10-50 mg del compuesto/Kg de peso corporal).

Es así como, el efecto antioxidante natural de los compuestos del ajo, es de sumo interés práctico ya que podría explicar algunos de sus efectos terapéuticos. Con respecto al desarrollo de la aterosclerosis, actualmente se acepta que los radicales libres juegan un papel importante en la deposición de colesterol en las paredes de los vasos sanguíneos. En las arterias, los sustratos de los RL son los ácidos grasos insaturados de las lipoproteínas de baja densidad (LDL); el daño oxidativo es acompañado por la pérdida de su función normal, ya que las ox-LDL son captadas por los macrófagos, los que se hinchan y mueren, resultando finalmente en masas de macrófagos muertos, las que son conocidas como células espumosas. Las células espumosas se colocan en la capa externa del endotelio del vaso e inician la primera etapa de la aterosclerosis. Los componentes del ajo inhiben la formación de RL,

apoyan los mecanismos endógenos de atrapar radicales libres y protegen contra la oxidación de las LDL lo cual puede contribuir al efecto cardioprotector del ajo (3,20).

5.2 Efecto antioxidante de los compuestos del ajo en estudios *in vivo*.

Tabla 17. Resumen de los estudios *in vivo* en donde se demuestra el efecto protector realizados con diferentes presentaciones y/o compuestos del ajo, en modelos de daño oxidativo.

Tratamiento	Estudio
Dieta con 2% de ajo en polvo	Daño por isquemia-reperusión en preparaciones de corazón aislado de ratas alimentadas con ajo crudo por 8 semanas (30).
	Nefrotoxicidad inducida por gentamicina en ratas alimentadas con ajo por 2 semanas (105).
Aceite de ajo	Nefrotoxicidad inducida por Fe-nitriotriacetato en ratas 50-100 mg/Kg/día tomada en el agua, una semana antes (106).
	Lipoperoxidación inducida por nicotina, en ratas 100 mg/Kg/día por 21 días (107).
Extracto de ajo envejecido	Cardiotoxicidad inducida por doxorubicina en ratón. 0.05 mL por vía intraperitoneal, 6 veces a la semana por 40 días (108).
	Daño por isquemia-reperusión en cerebro de ratas 0.08-0.5 mL/Kg. vía intraperitoneal, 30 minutos antes de la isquemia (109).
	Insuficiencia renal aguda inducida por gentamicina en ratas 1.2 mg/Kg. vía intraperitoneal, por 6 días (110).
S-alil cisteína (SAC)	Daño por isquemia-reperusión en cerebro de ratas 300 mg/Kg. vía intraperitoneal, 30 minutos antes de la isquemia (109,111).
	Insuficiencia renal aguda inducida por gentamicina en ratas. 125 mg/Kg/12 h. vía intraperitoneal, por 6 días (112).
	Hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono o acetaminofén en ratón. 100 mg/Kg/día. tomada 2 horas antes (113).
	Toxicidad por doxorubicina en ratón 30 mg/Kg. vía intraperitoneal por 5 días (114).
S-alil mercaptocisteína (SAMC)	Hepatotoxicidad inducida por acetaminofén (AAP) en ratón 200 mg/Kg. oralmente 0.5 h después de la administración de AAP (115).
	Hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono o acetaminofén en ratón 100 mg/Kg/día tomada por 2 horas antes (113).
Alicina	Daño por isquemia-reperusión en pulmón de ratas 0.1 mg en el inicio de la reperusión (116).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Dialilsulfuro (DAS)	Insuficiencia renal aguda inducida por gentamicina en ratas, dosis 50 mg/Kg/12 h, vía intragástrica, por 4 días (117).
Dialidilsulfuro (DADS)	Insuficiencia renal aguda inducida por gentamicina en ratas, dosis 50 mg/Kg/12 h, vía intragástrica, por 4 días (118).

5.3. Efecto antioxidante de los compuestos del ajo en cultivos celulares y tejidos.



El extracto de ajo envejecido y la SAC previenen el daño en la membrana, la pérdida de la viabilidad celular, la disminución en el contenido de GSH y la lipoperoxidación inducida por ox-LDL en células endoteliales de la arteria pulmonar (119,120).



La SAC inhibe la formación de H_2O_2 inducida por ox-LDL en macrófagos de ratón y en células endoteliales de vena umbilical e inhibe la activación de NF- κ B inducida por TNF- α o H_2O_2 (121).



El aceite de ajo, la SAC y la S-metil cisteína protegen a los hepatocitos de rata del daño producido por CCl_4 (122).



El EAE incrementa la actividad de GPx, SOD y catalasa; y disminuyen el anión superóxido y la producción de H_2O_2 en células endoteliales expuestas al sistema hipoxantina/xantina oxidasa o H_2O_2 (123).



El EAE reduce la toxicidad y el incremento en la peroxidación inducida por el bromobenceno en cortes histológicos de hígado (124,125).

5.4 Efecto antioxidante directo en estudios *in vitro* con compuestos del ajo



EXTRACTO ACUOSO DE AJO FRESCO.

- Reduce el radical hidroxilo (126-128) y el anión superóxido (128).
- Inhibe la lipoperoxidación (129), la oxidación de las LDL (130) y la formación de hidroperóxidos de lípidos (126-128).



EXTRACTO ACUOSO DE POLVO DE AJO.

- Reduce la producción del radical hidroxilo (131) y el anión superóxido (132).



EXTRACTO ACUOSO CALENTADO DE AJO FRESCO.

- Tiene la capacidad para disminuir la producción del radical hidroxilo (127) y para inhibir la lipoperoxidación (129).



EAE.

- Previene la lipoperoxidación (119,120,125,126,132-34) y la oxidación de la LDL (135).
- Previene la disminución de GSH (120) y aumenta el contenido de GSH (125,136) en células endoteliales.
- Atrapa H_2O_2 (110,120,123,137).
- Reduce el anión superóxido (110,123).
- Atrapa el radical ABTS (110).



ACEITE DE AJO.

- Previene la lipoperoxidación (122).



S-ALIL CISTEÍNA (SAC).

- Previene la lipoperoxidación (119,133,134,137) y la oxidación de las LDL (121,135).
- Atrapa H_2O_2 (121,137).
- Reduce la producción del anión superóxido (128) y de los radicales hidroxilo (128).
- Atrapa el radical ABTS (112)



S-ALIL MERCAPTOCISTEÍNA (SAMC).

- Atrapa H_2O_2 (112,137), inhibe la lipoperoxidación (122,134,137) y la oxidación de las LDL (119).



ALICINA.

- Atrapa radicales hidroxilo (138) y previene la lipoperoxidación (138).



ALINA.

- Atrapa radicales hidroxilo (139), peróxido de hidrógeno (137) e inhibe la lipoperoxidación (137) y la oxidación de las LDL (121).

6. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

De acuerdo con la información presentada anteriormente, surge el interés de comparar la actividad antioxidante *in vitro* de los diferentes compuestos de ajo, de las preparaciones comerciales y extractos de ajo obtenidos en el laboratorio medida por la capacidad para inhibir la oxidación de las LDL y para atrapas EROs.

6.1 Justificación.

Mucha de la información científica acerca del ajo solo se ha desarrollado en los últimos 50 años en los que se han validado algunas de sus propiedades medicinales. En la literatura científica y en las páginas de Internet se pueden apreciar encendidas polémicas sobre algunos de los efectos terapéuticos del ajo (33) debido en gran medida a que las conclusiones sobre su efecto terapéutico no se han obtenido del uso del ajo fresco sino del uso de presentaciones comerciales y extractos, los cuales difieren en su composición química. Estas diferencias se deben a que algunos de sus componentes sufren transformaciones durante su procesamiento y almacenamiento (2,3). Esta confusión se acabaría si los resultados obtenidos se atribuyeran específicamente a la preparación, al extracto en particular o al compuesto aislado del ajo y no al diente de ajo fresco. Entre las preparaciones comerciales de ajo y sus principales componentes se encuentran (2,3):

- (A)** Tabletas de polvo de ajo deshidratadas cubiertas o no con una capa entérica (alina, derivados γ -glutamilo, alinasa: "potencial de alicina").
- (B)** Cápsulas de aceite de ajo destiladas con vapor (alil/metil polisulfuros).
- (C)** Macerado de ajo en aceite vegetal (alil polisulfuros, ajoene, ditinas, tiosulfatos)
- (D)** Extracto de ajo envejecido en alcohol (SAC, derivados de γ -glutamilo).

Cabe señalar que la composición química del ajo fresco es muy diferente a la del ajo triturado debido a que cuando éste se corta la enzima alinasa se pone en contacto con su sustrato, la alina, para formar la alicina (2,3,22,33) y muchos de los productos encontrados en las preparaciones oleosas derivan precisamente de la alicina (2). La composición química del ajo en escabeche (ajo en vinagre) es parecida a la del ajo fresco debido a que el vinagre y el calentamiento que se usan en su preparación inactivan a la alinasa. La diferencia entre el ajo fresco y el ajo en escabeche consiste en que a pesar de que éste último se triture, no se va a generar la alicina, ni sus

derivados, los cuales son responsables del intenso olor y sabor del ajo fresco triturado. Además, un problema muy importante que se presenta en la obtención de los extractos y productos comerciales del ajo es que se carece de estandarización en la preparación y en la identificación cualitativa y cuantitativa de sus componentes (2). Otro problema es que no se conoce la biodisponibilidad de la mayoría de los componentes del ajo ni se han comparado los efectos benéficos de las preparaciones comerciales y de los extractos con los del ajo fresco. En los productos comerciales del ajo disponibles en México hemos encontrado que, en la mayoría de las presentaciones, el ajo está mezclado o combinado con otros compuestos como lecitina, ginko biloba, vitaminas y aceites vegetales, lo que impide que podamos atribuir exclusivamente al ajo cualquier efecto medicinal que estas preparaciones tuvieran. Por esa razón, en este proyecto se plantea estudiar solo las preparaciones comerciales de polvo de ajo sin ningún otro producto, así como extractos de ajo fresco y de ajo en escabeche que son consumidos comúnmente por la población.

Por otro lado, apenas se empiezan a explorar los mecanismos por medio de los cuales el ajo ejerce sus efectos terapéuticos, por lo que se requieren más estudios en modelos experimentales *in vivo* y en sistemas *in vitro* para conocer y profundizar en los mecanismos por los que ocurren dichos efectos. Es importante recalcar que no se han realizado estudios comparativos entre el ajo fresco, los diferentes extractos y las presentaciones del ajo sobre la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), la protección de la células LLC-PK1 contra el daño causado por gentamicina y no se conoce(n) el(los) compuesto(s) del ajo responsable(s) de dichos efectos. También es importante señalar algunas cifras en nuestro país en relación con estas enfermedades: se estima que en México 18 millones de personas presentan problemas de hipertensión arterial y gran parte de ellos padecen enfermedades cardiovasculares (140). Cuando este padecimiento no se controla oportuna y adecuadamente puede provocar ataque al corazón, enfermedad cerebro-vascular e insuficiencia renal, entre otros. Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en el mundo; en México ocupan esta posición desde hace 22 años. En el año 2000 fallecieron 68 mil 716 personas en nuestro país por esta causa, es decir, el 15.7 % del total de las defunciones (140). Además, se conoce que la **oxidación de las LDL** es un factor muy importante de riesgo cardiovascular (141,142) y que el estrés oxidativo, están involucradas en la hipertensión experimental (143,145). También debemos mencionar

que la nefrotoxicidad por gentamicina se presenta en el 30% de los pacientes tratados por más de 7 días con este antibiótico (146).

La información anterior justifica ampliamente la realización de este proyecto que es un estudio comparativo de diferentes presentaciones y compuestos del ajo sobre la oxidación de las LDL. En el proyecto, también se estudiarán algunos posibles mecanismos por los cuales el ajo pudiera ejercer su papel protector. Por lo tanto, la información obtenida contribuirá, indudablemente, a la generación y al avance del conocimiento científico, lo que permitirá hacer recomendaciones para el consumo humano durante la hipertensión arterial, las enfermedades cardiovasculares, la insuficiencia renal aguda y la insuficiencia renal crónica.

Las preguntas que se tratan de contestar con este proyecto son:

1. ¿Algunas de las presentaciones de polvo de ajo que se comercializan en México, el extracto obtenido de dientes de ajo en escabeche, el extracto de ajo envejecido y los siguientes compuestos del ajo: alina, alicina, SAC, SAMC, y γ -glutamil SAC tienen propiedades antioxidantes e inhiben la oxidación de las LDL y tienen la capacidad de aminorar la nefrotoxicidad *in vitro* inducida por gentamicina en células LLC-PK1 en cultivo?
2. ¿Las propiedades terapéuticas del extracto de ajo fresco difieren de las presentaciones arriba mencionadas?

6.2 Antecedentes y contenido innovador.

El ajo es una de las plantas medicinales mas estudiadas, la investigación muestra un crecimiento exponencial como se puede apreciar en la distribución temporal de los 1644 artículos del ajo registrados en PubMed, como ya se mencionó en el capítulo 1, (1963-a la fecha): 862 se publicaron entre de la mitad de la década de los 90 al 2002. Esto indica que se han publicado más de la mitad del total de artículos, lo que resalta el número creciente de investigadores dedicados al estudio del ajo.

Por otro lado, la **importancia económica** del ajo también muestra un crecimiento explosivo ya que las ventas de los productos derivados del ajo alrededor del mundo siguen aumentando (33). Simplemente en Estados Unidos, las ventas de suplementos de ajo en 1993 alcanzaron la cantidad de 31.3 millones de dólares, lo que representó el 9.8% del total de la venta de productos derivados de plantas en las tiendas de suplementos alimenticios para la salud (33,147). Un año después las ventas aumentaron 26% a 39.4 millones de dólares y para el año 2000 las ventas alcanzaron

los 61.2 millones de dólares (148). En Alemania, las ventas de suplementos de ajo en 1993 fueron de 100 millones de dólares y se estima que un 8% de la población alemana consume regularmente estos suplementos. En Canadá se estima que las ventas anuales de suplementos de ajo entre 1995-1996 fueron de 36 millones de dólares (el 30% del total de las ventas de derivados de plantas medicinales vendidas en Canadá).

Además este interés e importancia del ajo y de otros suplementos derivados de plantas promovió que el 22 y 23 agosto de 2002, el Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre, la Oficina de Suplementos Dietarios del Instituto Nacional de Salud y el Centro Nacional de Medicina Complementaria y Alternativa organizaran el taller "Mechanistic Studies of Cardiovascular Effects of Botanicals" en Bethesda, Maryland (<http://ods.od.nih.gov/news/conferencias/botanical.html>) en el que se hizo un análisis crítico acerca de las propiedades medicinales del ajo, se identificaron lagunas de investigación en el área y se propusieron nuevas estrategias de investigación.

El presente proyecto tiene como propósito continuar, ampliar y profundizar el trabajo de investigación realizado en nuestro laboratorio en la Facultad de Química de la UNAM sobre las propiedades terapéuticas del ajo y algunos de sus compuestos.

Resultados anteriores:

(A) La alimentación con polvo de ajo al 2% fue capaz de aminorar la IRA inducida por gentamicina. Además fue capaz de bloquear el aumento en la lipoperoxidación renal y de prevenir la disminución renal en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y Gpx (105).

(B) La alimentación con polvo de ajo fue capaz de prevenir la hipertlipidemia (el aumento de triglicéridos, de colesterol total y de colesterol-LDL) en el modelo de síndrome nefrótico crónico (149), y

(C) La alimentación con polvo de ajo modificó postranscripcionalmente la expresión renal y hepática de la enzima antioxidante catalasa (150). A esta conclusión se llegó mediante estudios de Northern blot, western blot, actividad y medición de la síntesis y degradación de esta proteína.

Recientemente se ha encontrado que el DAS (117) y el DADS (118), el EAE (110) y la SAC (112) pero no el DATS (151), protegen parcialmente del daño inducido por gentamicina. También se ha observado que el EAE es capaz de prevenir el aumento en riñón de proteínas nitradas (medida por inmunohistoquímica de nitrotirosina) y de proteínas oxidadas (medidas espectrofotométricamente), ambos indicadores de estrés

oxidativo (110). Además el extracto acuoso de polvo de ajo es capaz de prevenir la muerte de células de túbulo proximal renal (células LLC-PK1) inducida por gentamicina, lo cual confirma los datos obtenidos previamente *in vivo* (Maldonado PD, datos no publicados). Además de sus propiedades intrínsecas, el ajo también podría incrementar la capacidad antioxidante aumentando la expresión de las principales enzimas antioxidantes (glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa, y catalasa), de las enzimas del sistema tioredoxina-peroxiredoxinas (peroxiredoxinas, tioredoxina y tioredoxina reductasa) (152) y de las enzimas productoras de NADPH (enzima málica y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa) (153,154). También se han desarrollado métodos *in vitro* para evaluar la capacidad antioxidante del ajo y sus diferentes presentaciones. Se han establecido dos métodos (uno enzimático y otro no enzimático) para estudiar la capacidad atrapadora de iones superóxido y un método para medir la capacidad atrapadora de peróxido de hidrógeno.

6.3 Objetivos y Metas.

1. Estudiar la capacidad antioxidante *in vitro* de:

- a) Los compuestos aislados del ajo: alina y γ -glutamil SAC (presentes en el diente de ajo fresco), alicina y SAC y SAMC (presentes en el EAE).
- b) Las preparaciones comerciales de ajo: extracto de ajo envejecido (Kyolic, Wakunaga of America, Misión Viejo, CA, EUA), Arkocápsulas (Lab Arkopharma, Carros, Francia), Cirkulin (Roha Arzneimittel GmbH, Bremen, Alemania), ajo deshidratado (Laboratorio de Productos Naturales Azteca, México, DF.) y Vita Ajo (Mexinatura SA de CV, México, DF). De las 20 preparaciones comerciales encontradas en la Ciudad de México, se seleccionaron las cuatro mencionadas arriba porque contienen únicamente polvo de ajo.
- c) Extracto acuoso obtenido a partir de: polvo de ajo, dientes de ajo, dientes de ajo y calentado, dientes de ajo previamente hervidos y dientes de ajo hervidos con ácido acético al 5%.

Los compuestos, presentaciones y extractos que presenten efecto antioxidante se emplearán para:

Evaluar la capacidad citoprotectora del ajo en células LLC-PK1 en cultivo incubadas con gentamicina, la cual constituye un modelo de nefrotoxicidad *in vitro*.

6.4 Metodología.

1. Síntesis de compuestos organosulfurados del ajo.

a) Alicina. Pesar 0.1 mol de dialil disulfuro y disolver en 500 ml de CHCl_3 en baño de hielo. Adicionar 0.1 mol de *m*-cloro ácido perbenzoico en CHCl_3 a la solución de dialil disulfuro. Adicionar 0.1 mol de NaHCO_3 y neutralizar los ácidos. Eliminar el CHCl_3 . Adicionar *n*-hexano y extraer con H_2O . Los extractos acuosos se extraen con *n*-hexano. Extraer la solución de H_2O residual con éter etílico anhidro. Evaporar el éter diluir el residuo oleoso 1:100 en CHCl_3 frío y congelar a -70°C hasta su uso (155).

b) SAC. Pesar 5.25 g de L-cisteína-HCl y disolver en etanol absoluto. Adicionar Na y bromuro de alilo y dejar la reacción 3 h. Adicionar H_2O y ajustar el pH a 4.5-5. Eliminar el exceso de disolvente y recristalizar el precipitado con etanol; agua (38).

c) γ -glutamil S-alil cisteína. Bloquear el ácido glutámico γ -carboxi activado por el tratamiento de N-*t*-Boc-L-ácido glutámico α -*t*-butil ester con N-hidroxisuccinamida y 1,3-diciclohexilcarbodiimida. Preparar la γ -glutamil S-alil cisteína por la reacción de S-alil cisteína-HCl y de glutamato bloqueado y activado. Eliminar el disolvente y desproteger con ácido trifluoroacético (38).

d) SAMC. Obtener a partir de la reacción de la L-cisteína con alicina, basado en el hecho de que 1 molécula de alicina reacciona rápida y cuantitativamente con 2 moléculas de cisteína para formar 2 moléculas de S-alil mercaptocisteína (23).

2. Obtención de los extractos de ajo en el laboratorio.

a) Extracto acuoso de ajo a partir de polvo de ajo. Pesar 0.5 g de polvo de ajo, adicionar 3 mL de H_2O destilada y agitar 15 min a temperatura ambiente. Centrifugar la suspensión a 8000 x g durante 5 min y obtener el sobrenadante.

b) Extracto acuoso de ajo a partir de dientes de ajo. Pesar la cantidad necesaria de dientes de ajo (comprados en el supermercado), cortar finamente y homogenizar con un politrón en H_2O destilada suficiente para obtener una concentración de 100 mg/ml. Centrifugar el homogenizado a 3,125xg por 10 min y obtener el sobrenadante.

c) Extracto acuoso de ajo calentado a partir de dientes de ajo. Obtener el extracto acuoso a partir de dientes de ajo como se menciona en el inciso anterior. Calentar

diferentes extractos durante 10, 20, 40 y 60 min cada uno, en un baño de agua hirviendo.

d) Extracto acuoso de ajo a partir de dientes de ajo previamente hervidos. Pesar la cantidad necesaria de dientes de ajo y hervir durante 10 min, cortar finamente y homogenizar con un politrón en H₂O destilada suficiente para obtener una concentración de 100 mg/ml. Obtener el sobrenadante como se menciona en el inciso b.

e) Extracto acuoso de ajo a partir de dientes de ajo hervidos en ácido acético 5% (ajos en escabeche). Pesar la cantidad necesaria de dientes de ajo y hervir durante 5 min en ácido acético al 5%_cortar finamente y homogenizar con un politrón en H₂O destilada suficiente para obtener una concentración de 100 mg/ml. Obtener el sobrenadante como se menciona en el inciso b.

3. Métodos para evaluar la actividad antioxidante *in vitro*.

a) Anión superóxido.

Método enzimático usando nitroazul de tetrazolio (NBT) como aceptor de los electrones. La xantina oxidasa cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico, generándose además anión superóxido. Este último reduce al NBT formando un producto insoluble y colorido (formazán) que absorbe a 560 nm. Es necesario medir la absorbencia a 295 nm, longitud a la que absorbe el ácido úrico, para asegurar que el compuesto de estudio no afecta la actividad de la xantina oxidasa (156).

Método enzimático usando citocromo C como aceptor de los electrones. El anión superóxido generado como se menciona en el método anterior, reduce al ferri-citocromo c, para formar ferro-citocromo c, el cual absorbe a 550 nm (157,158). Es necesario medir la absorbencia a 295 nm, longitud a la que absorbe el ácido úrico, para asegurar que el compuesto de estudio no afecta la actividad de la xantina oxidasa (156).

Método no enzimático usando NBT como aceptor de electrones. Se emplea fenazina metosulfato (PMS) como transportador de electrones del NADH al NBT, siendo éste el aceptor final de los electrones (159). El NADH no reduce directamente al

NBT, pero la PMS puede acoplar al NADH con el NBT incrementando así la de reducción de éste.

b) Peróxido de hidrógeno. Medir la oxidación del rojo de fenol mediada por la peroxidasa de rábano. Leer la absorbencia a 619 nm. Interpolar los datos en una curva estándar de H_2O_2 (1 a 20 μM) para determinar la concentración de H_2O_2 (160).

c) Radical hidroxilo. Este radical se mide por la oxidación de ácido ascórbico catalizada por hierro (161). La degradación de la desoxirribosa por el radical hidroxilo se mide usando el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (162).

d) Medición de la capacidad de inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). La oxidación de las LDL se sigue midiendo la formación de dienos conjugados a 234 nm. Aislar las LDL de sujetos normales por ultracentrifugación y oxidarlas una solución de $CuSO_4$ 25 μM a 37°C en presencia y ausencia de los diferentes compuestos, presentaciones comerciales y extractos acuosos del ajo. Seguir la técnica descrita por Posadas-Sánchez *et al.* (163).

4. Cultivo de células LLC-PK1 y ensayos de citoprotección con los compuestos, preparaciones comerciales y extractos de ajo.

Emplear células LLC-PK1, que es una línea celular de túbulo proximal porcina bien caracterizada y ampliamente utilizada. Cultivar las células en cajas Petri de 10 cm en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, pH 7.3, sin antibióticos y mantener a 37°C en una atmósfera de O_2 y 5% de CO_2 . Subcultivar las células dos veces a la semana antes de alcanzar la confluencia. Para esto, lavar las células con amortiguador de fosfatos, desprender de la caja con solución salina de PBS suplementada con tripsina 0.25% y transferir a nuevas cajas Petri. Realizar todos los ensayos sembrando las células en cajas de 96 pozos e iniciar cuando las células estén en confluencia, la cual se detecta al microscopio.

a) Curso temporal y estudios dosis-respuesta con gentamicina (GM). Para el curso temporal (días 3,4,5 y 6), emplear las concentraciones de GM 1 y 2 mM (dosis empleadas en la literatura) (164,165), para elegir el tiempo en que se realizarán los estudios. En el estudio dosis-respuesta, realizar curvas de citotoxicidad con diferentes

concentraciones de GM (0.005-7.0 mM) para obtener la LD₅₀, y la dosis de los estudios posteriores. Con la dosis y el tiempo óptimos, realizar los estudios de citoprotección con los compuestos, las presentaciones y/o los extractos acuosos de ajo que hayan mostrado actividad antioxidante.

b) Estudios dosis respuesta con los compuestos, las presentaciones y/o los extractos acuosos de ajo. Obtener la concentración de los compuestos, las presentaciones y/o los extractos acuosos de ajo ha emplearse en los estudios de citoprotección, a partir de una curva dosis-respuesta, donde se evalúen diferentes concentraciones de estos.

c) Efecto de los compuestos, las presentaciones y/o los extractos acuosos de ajo, sobre la muerte celular inducida por la GM. Incluir en cada experimento, los siguientes grupos: 1) control (CT), con medio de cultivo (MC); 2) gentamicina (GM), con GM disuelta en MC a la concentración final deseada; 3) compuesto, presentación o extracto acuoso de ajo (A), con el compuesto, la presentación o el extracto acuoso de ajo disuelto en MC a la concentración final deseada y 4) gentamicina + compuesto, presentación o extracto acuoso de ajo (GM+A), con GM y compuesto, presentación o extracto acuoso de ajo disueltos en MC a la concentración final deseada.

Realizar todos los experimentos en esterilidad y cambiar el medio de cultivo cada 24 horas durante el tiempo de estudio. Evaluar la viabilidad celular empleando:

c.1) Cristal violeta. Fijar las células a los pozos con glutaraldehído al 1.1% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Adicionar el cristal violeta por 15 minutos, eliminar el exceso de colorante, disolver el que queda unido a las proteínas celulares con ácido acético al 10% y leer la absorbencia a 590 nm.

c.2) Bromuro de dimetiltiazol difeniltetrazolio (ensayo de MTT). Cuatro horas antes de que concluya el tratamiento, adicionar el MTT a una concentración final de 2 mg/mL, eliminar el MTT no reducido con PBS y disolver el formazán de MTT contenido en las células con HCl 0.1 M en isopropanol. Leer espectrofotométricamente a 570 nm, la concentración de formazán de MTT, la cual es directamente proporcional al número de células vivas. El MTT en las mitocondrias de células vivas es reducido por el sistema de dehidrogenasas a formazán de MTT (1-[4,5-dimetil tiazol-2-il]-3,5-difenilformazan). El MTT es amarillo y soluble en agua mientras que su forma reducida, el formazán de MTT, es morada e insoluble en agua.

7. DISCUSIÓN

Sabemos ahora que el ajo es, quizá, la planta más estudiada desde la antigüedad en muchas culturas alrededor de todo el mundo y que en la actualidad tiene un marcado auge la investigación de los compuestos que lo componen, ya que se han realizado un sin fin de estudios los cuales difieren en contenido ya que utilizan distintas preparaciones y/o presentaciones de ajo que son distribuidas en el mercado para el consumo humano, ya que hoy en día los medicamentos de origen natural han ido retomando una creciente importancia para el tratamiento de padecimientos cardiovasculares y envejecimiento principalmente, lo que nos lleva a entender que la mayoría de los compuestos del ajo tienen propiedades antioxidantes y que algo sin duda muy útil es señalar a la población, en particular a la mexicana, cuál o cuáles de estos compuestos de acuerdo con la manera de preparar los alimentos se encuentran presentes en ellos para obtener los efectos benéficos para los padecimientos antes mencionados. Como vimos en la presente tesis, en los países europeos como Alemania, España y Francia, el ajo es muy conocido y se encuentra en la mayoría de los suplementos alimenticios manufacturados por la industria farmacéutica de ese continente, muchos de los cuales son traídos a nuestro país, sin embargo, en México son pocos los suplementos encontrados con las especificaciones de los compuestos de ajo y muchos menos con los datos de estandarización, como cualquier producto farmacéutico de la medicina alopática lo requiere. Este es sin duda un gran problema, ya que en primer lugar, no se tiene bien definido cuales son los principios activos presentes en el producto y mucho menos su concentración (para definir la posible dosis terapéutica) además que tampoco se han realizado estudios para saber cual o cuales son los principios activos responsables de dichos efectos. Por lo cual se eleva la importancia de difundir entre la población la manera de consumir el ajo en su alimentación; ya que como vimos en el diente entero no se encuentran los principales compuestos antioxidantes, y al cortar, triturar o bien masticar el ajo, se obtienen los tiosulfatos (alicina) los cuales se convertirán ya sea por el cocimiento moderado de los alimentos o bien a lo largo del tracto gastrointestinal en compuestos más liposolubles para ser absorbidos en el intestino. Sin embargo vimos también que uno de los compuestos con mayor actividad antioxidante es la SAC, y que ésta se encuentra presente en el EAE, un producto que aún no se comercializa en nuestro país.

8. PERSPECTIVAS

Después de definir cual o cuales de los compuestos tienen propiedades atrapadoras de los radicales libres o para inhibir la oxidación de las LDL; derivados de las diferentes preparaciones en que el ajo es consumido en nuestra población, y de identificar la presentación comercial en la que encontramos los compuestos probados, tenemos la oportunidad de desarrollar futuros estudios *in vivo*, en los cuales se utilicen modelos de nefrotoxicidad como los ya probados en el laboratorio, como la nefrotoxicidad inducida por gentamicina, por dicromato de potasio, por isquemia reperusión y más recientemente por D-serina.

La hipertensión arterial es un problema de salud pública muy importante y las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar de muerte en el país y la oxidación de las LDL es un factor de riesgo cardiovascular muy importante debido a éste en la mayoría de los casos, los pacientes deben tomar costosos tratamientos de por vida. La insuficiencia renal crónica (IRC) es irreversible y conduce a la diálisis con un alto costo económico para el paciente y/o las instituciones públicas de salud. La insuficiencia renal aguda inducida por gentamicina también se presenta en un 30% de los pacientes tratados por más de 7 días con este antibiótico lo que complica y encarece su tratamiento. Por lo tanto, se deben alentar proyectos encaminados a buscar tratamientos menos costosos y con menos complicaciones secundarias, como los que podríamos encontrar con el ajo y sus derivados, para disminuir la hipertensión arterial y la IRA, retardar la progresión del daño renal y prevenir la oxidación de las LDL. Nuestro laboratorio ha estado realizando, en los últimos años, varias aportaciones relevantes al conocimiento de las propiedades medicinales del ajo en modelos experimentales de hipertensión arterial, hiperlipidemia y nefrotoxicidad por gentamicina. Consideramos que es justificable dar continuidad a los estudios que nuestro grupo ha realizado. Por ejemplo, el trabajo *in vivo* de nefrotoxicidad por gentamicina iniciado en animales completos se planea continuar con experimentos en células epiteliales renales en cultivo incubadas con gentamicina (lo que representa un modelo de nefrotoxicidad *in vitro*), y el trabajo iniciado en el modelo de hiperlipidemia *in vivo* se planea continuar con experimentos de prevención de la oxidación de las LDL *in vitro*. También se han generado datos preliminares que nos alientan para profundizar en los posibles mecanismos responsables de los efectos terapéuticos del ajo y de sus componentes. La realización de estudios comparativos entre las diferentes presentaciones comerciales, extractos y compuestos del ajo permitirá hacer recomendaciones para su consumo basadas en datos científicos y no en datos anecdóticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kemper KJ. The Longwood Task Force: <http://mcp.edu/herbal/default.htm>.
2. Koch HP, Lawson LD. Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species; Williams & Wilkins: Baltimore 1996.
3. Lawson LD. Garlic. A review of its medicinal effects and indicated active compounds. En: Lawson LD & Bauer R, eds. *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity*. American Chemical Society Symposium series 691, Washington, DC 1998. pp 176-209.
4. Coello C. Situación actual, características y técnicas de cultivo del ajo. El quincenal vida rural 2002;148: Madrid, España. <http://www.infoagro>.
5. Gruenwald J. *HerbalGram* 1995;34:60-5.
6. Block E, Cai XJ, Uden PC, Zhang X, Quimby DB, Sullivan JJ. Allium chemistry: Natural abundance of organoselenium compounds from garlic onions and related plants and in human garlic breath. *Pure Appl Chem* 1996;68:937-44.
7. Dong Y, Lisk D, Block E, Ip C. Characterization of the biological activity of gamma-glutamyl-Se-methylselenocysteine: a novel, naturally occurring anticancer agent from garlic. *Cancer Res* 2001;61:2923-8.
8. Block E. The organosulfur chemistry of the genus *Allium*: implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew Chem Int Ed Engl* 1992;31:1135-78.
9. Block E, Calvey EM. En: *Sulfur Compounds in Foods*; Mussinan, C.J, Keelan, ME, Eds, American Chemical Society Symposium series 564, Washington, DC 1994. pp 63-9.
10. Calvey EM, White KD, Matusik JE, Sha D, Block E. Allium chemistry: identification of organosulfur compounds in ramp (*Allium tricoccum*) homogenates. *Phytochemistry* 1998;49:359-64.
11. Lawson LD. En: *Human medicinal agents from plants*; Kinghorn AD, Balandrin MF, Eds, American Chemical Society Symposium series 534, Washington, DC 1993. pp 306-30.
12. Sendi A. *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 1. Chemistry, analysis, history, botany. *Phytomedicine* 1995;4:323-39.
13. Reuter HD. *Allium sativum* and *Allium ursinum*: part 2. Pharmacology and medicinal application. *Phytomedicine* 1995;2:73-91.
14. Srivastava KC, Bordia A, Verma SK. Garlic (*Allium sativum*) for disease prevention. *S Afr J Sci* 1995;91:68-77.
15. Agarwal KC. Therapeutic actions of garlic constituents. *Med Res Rev* 1996;16:111-24.
16. Bradley P. Garlic. En: *British Herbal Compendium*; Peter B, Ed. 1992; pp 105-8.
17. Leung AY, Foster S. *Encyclopedia of common natural ingredients used in food drugs, and cosmetics*: John Wiley & Sons, Inc 1996; pp 260-4.
18. Weiss RF. *Herbal Medicine*; Beaconsfield Publishers; Beaconsfield, England, 1998; pp 170-5.
19. Hahn G. History, folk medicine and legendary uses of garlic. En: *Garlic: the science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species*; William & Wilkins: Baltimore, 1996; pp 1-24.
20. Fulder S, Blackwood J. *Garlic Nature's original Remedy*; Healing Arts Press: Rochester, Vermont, 1991.
21. Bergner P. The healing power of garlic. Prima Publishing; Rocklin CA, 1996.
22. Block E. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am* 1985;252:114-9.
23. Cavallito CJ, Buck JS, Suter CM. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*, determination of the chemical structure. *J Am Chem Soc* 1944;66:1952-4.
24. Koch HP, Jäger W, Groh U, Hovie JE, Planck G, Sedlak U, Praznik W. Carbohydrates from garlic bulbs (*Allium sativum* L.) as inhibitors of adenosine deaminase enzyme activity. *Phytother Res* 1993;7:387-9.
25. Ip C, Lisk DJ, Stoewsand GS. Mammary cancer prevention by regular garlic and selenium-enriched garlic. *Nutr Cancer* 1992;17:279-86.
26. Cai XJ, Block E, Uden PC, Zhang X, Quimby BD, Sullivan JJ. Allium chemistry: identification of selenamino acids in ordinary and selenium-enriched garlic, onion, and broccoli using gas chromatography with atomic emission detection. *J Agric Food Chem* 1995;43:1754-7.

27. Ge H, Cai XJ, Tyson JF, Uden PC, Denoyer ER, Block E. Identification of selenium species in selenium enriched garlic, onion, and broccoli. Sing high performance ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Anal Commun* 1996;33:279-81.
28. Ueda Y, Kawajiri H, Miyamura N, Miyajima R. Content of some sulfur-containing components and free amino acids in various strains of garlic. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. J Jpn Soc Food Sci Technol* 1991;38:429-34.
29. Matsuura H, Inagaki M, Maeshige K, Ide N, Kajimura Y, Itakura Y. Changes in content of gamma-glutamyl peptides and fructan during growth of a *Allium sativum*. *Planta Med* 1996;62:70-1.
30. Rietz B, Isensee H, Strobach H, Makdessi S, Jacob R. Cardioprotective actions of wild garlic (*Allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1993;119:143-50.
31. Wen GY, Mato A, Maikik MN, Jenkins EC, Sheikh AM. Light and electron microscopic immunocytochemical localization of two major proteins in garlic bulb. *J Cell Biochem* 1995;58:481-9.
32. Tchermichev B, Rabinkov A, Mirelman D, Wilchek M. Natural antibodies to allinase (Allin lyase) and mannose-specific lectin from garlic (*Allium sativum*) in human serum. *Immunol Lett* 1995;47:53-7.
33. Block E. Garlic as a functional food: a status report. En: Shibamoto T, Terao J, Osawa T, Eds. *Functional foods for disease prevention II*. American Chemical Society Symposium series 702, Washington, DC 1998. pp 125-43.
34. Stoll A, Seebeck E. Chemical investigations on alliin, the specific principle of garlic. *Adv Enzymol* 1951;11:377-400.
35. Lawson LD, Hughes BG. Characterization of the formation of allicin and other thiosulfonates from garlic. *Planta Med* 1992;58:345-50.
36. Eilmore GS, Feldberg RS. Allin lyase localization in bundle sheaths of the garlic clove (*Allium sativum*). *Am J Bot* 1994;81:89-94.
37. Van Damme EJ, Smeets K, Torrekens S, Van Leuven F, Peumans W. Isolation and characterization of allinase cDNA clones from garlic (*Allium sativum* L) and related species. *Eur J Biochem* 1992;209:751-7.
38. Lawson LD, Wood SG, Hughes BG. Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialk(enyl) thiosulfonates in commercial garlic products. *Planta Med* 1991;57:363-70.
39. Block E, Naganathan S, Putnam D, Zhao SH. Allium chemistry: HPLC analysis of thiosulfonates from onion, garlic, wild garlic (ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive and chinese chive: uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples. *J Agric Food Chem* 1992;40:2418-30.
40. Block E, Ahmad S, Catalfamo JL, Jain MK, Apitz-Castro, R. The chemistry of alkyl thiosulfinate esters IX. Antithrombotic organosulfur compounds from garlic: structural, mechanistic, and synthetic studies. *J Am Chem Soc* 1986;108:7045-55.
41. Darbyshire B, Henry RJ. Differences in fructan content and synthesis in some Allium species. *New Phytol* 1981;87:249-56.
42. Feray S, Auger J. What is the true odour of cut Allium? Complementarity of various hyphenated methods: Gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with particle beam and atmospheric pressure ionization interface in sulphenic acids rearrangement component discrimination. *J Chromatogr* 1996;750:63-74.
43. Cai XJ, Block E, Uden PC, Quimby BD, Sullivan JJ. Allium chemistry: identification of natural abundance of organoselenium compounds in human breath after ingestion of garlic using gas chromatography with atomic emission detection. *J Agric Food Chem* 1995;43:1751-3.
44. Laakso I, Seppänen-Laakso T, Hiltunen R, Müller B, Jansen H, Knobloch K. Volatile garlic odor components: gas phases and adsorbed exhaled air analysed by headspace gas chromatography-mass spectrometry. *Planta Med* 1989;55:257-61.
45. Blankenhorn MA, Richards CE. Garlic breath odor. *J Am Med Assoc* 1936;107:409-10.

46. Taucher J, Hansel A, Jordan A, Lindinger W. Analysis of compounds in human breath after ingestion of garlic using proton-transfer-reaction mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 1996;44:3778-82.
47. Ruiz R, Hartman TG, Kamas K, Lech J, Rosen RT. En: *Food Phytochemicals for cancer prevention I*; Huang M.T, Osawa T, Ho CT, Rosen RT, Eds; American Chemical Society Symposium series 546, Washington, DC 1994. pp 102-19.
48. Mennella JA, Beauchamp GK. Maternal diet alters the sensory qualities of human milk and the nursing's behavior. *Pediatrics* 1991;88:737-44.
49. Mennella JA, Beauchamp GK. The effects of repeated exposure to garlic-flavored milk on the nursing's behavior. *Pediatr Res* 1993;34:805-8.
50. Lawson LD, Wang ZJ, Hughes BG. Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialk(enyl) thiosulfonates in commercial garlic products. *Planta Med* 1991;57:363-70.
51. Iberl B, Winkler G, Knobloch K. Products of alliin transformation: ajoenes and dithiols, characterization and their determination by HPLC. *Planta Med* 1990;56:202-11.
52. Lawson LD, Ransom DK, Hughes BG. Inhibition of whole blood platelet-aggregation by compounds in garlic clove extracts and commercial garlic products. *Thromb Res* 1992;65:141-56.
53. Egen-Schwind C, Eckard R, Kemper FH. Metabolism of garlic constituents in the isolated perfused rat liver. *Planta Med* 1992;58:301-5.
54. Jandke J, Spittler G. Unusual conjugates in biological profiles originating from consumption of onions and garlic. *J Chromatogr* 1987;421:1-8.
55. http://www.albany.edu/chemistry/block_personal.html
56. Lawson LD, Wang ZYJ, Hughes BG. Gamma-glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other *Allium* species: precursors of age-dependent trans-1-propenyl thiosulfonates. *J Nat Prod* 1991;54:436-44.
57. Blania G, Spangenberg B. Formation of alliin from dried garlic (*Allium sativum*): a simple HPTLC method for simultaneous determination of alliin and ajoene in dried garlic and garlic preparations. *Planta Med* 1991;57:371-5.
58. Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Tsai SJ, Lii CK. Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. *Food Chem Toxicol* 2001;39:563-69.
59. Mennella JA, Johnson A, Beauchamp GK. Garlic ingestion by pregnant women alters the odor of amniotic fluid. *Chem Senses* 1995;20:207-9.
60. Lachmann G, Lorenz D, Radeck W, Steiper M. The pharmacokinetics of the S35 labeled labeled garlic constituents alliin, alliin and vinyldithiine. *Arzneimittelforschung* 1994;44:734-43.
61. Bordia T, Mohammed N, Thomson M, Ali M. An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;54:183-6.
62. Lawson LD, Wang ZJ. Pre-hepatic fate of the organosulfur compounds derived from garlic (*Allium sativum*). *Planta Med* 1993;59:A688.
63. Lawson LD, Wang ZYJ, Hughes BG. Gamma-glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other *Allium* species: precursors of age-dependent trans-1-propenyl thiosulfonates. *J Nat Prod* 1991;54:436-44.
64. Brady JF, Ishizaki H, Fukuto JM, Lin MC, Fadel A, Gapac JM, Yang CS. Inhibition of cytochrome P-450 2E1 by diallyl sulfide and its metabolites. *Chem Res Toxicol* 1991;4:642-7.
65. Pentz R, Guo Z, Siegers CP. Bioverfügbarkeit und Stoffwechsel von präparaten. *Med Welt* 1991;42:46-7.
66. Nagae S, Ushijima M, Hatano S, Imai J, Kasuga S, Matsuura J, Itakura Y, Higashi Y. Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Med* 1994;60:214-7.
67. de Rooij BM, Bhoogaard PJ, Rijkse DA, Commandeur JN, Vermeulen NP. Urinary excretion of N-acetyl-S-allyl-L-cysteine upon garlic consumption by human volunteers. *Arch Toxicol* 1996;70:635-9.
68. Zentella M, Saldaña B. Papel fisiológico de los radicales libres. *Bol Educ Bioq (México)* 1996;15:152-61.

69. Olinescu R, Smith TL. Free radicals in medicine. Nova Science Publishers, Inc New York, USA, 2002 pp 183.
70. Granados Silvestre MA. Efecto del ajo en polvo sobre el síndrome nefrótico y la hipertensión. Tesis de Maestría en Ciencias (Bioquímicas). Facultad de Química. UNAM. 1999.
71. Janssen YMW, Van Houten B, Borm PJA, Mossman BT. Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage. Lab Invest 1993;69:261-74.
72. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. Am J Med 1991;91 (suppl 3C): 2S-13S.
73. Baud L, Ardaillou R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. Am J Physiol 1986;251:F765-76.
74. Bannister JV, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. CRC Crit Rev Biochem 1987;22:111-80.
75. Johnson RJ, Couser WG, Chi EY, Adler S, Klebanoff SJ. New mechanism for glomerular injury. Myeloperoxidase-hydrogen peroxide-haile system. J Clin Invest 1987;79:1379-87.
76. Olivares Corichi IM. Efecto del ajo sobre la nefrotoxicidad por gentamicina; papel de las especies reactivas de oxígeno y las enzimas antioxidantes. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental). Facultad de Ciencias. UNAM. 2000
77. Huberman A. Biología de los radicales del oxígeno. En: Bioquímica. Díaz ZJC, Hicks GJJ (eds) Interamericana Mc Graw Hill, México DF, 1995.
78. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). J Biol Chem 1969;244:6049-55.
79. Ho YS, Howard AJ, Crapo JD. Molecular structure of a functional rat gene for manganese containing superoxide dismutase. Am J Respir Cell Mol Biol 1991;4:278-86.
80. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. J Biol Chem 1973;248:4793-6.
81. Hsu JL, Visner GA, Burr IA, Nick HS. Rat copper/zinc superoxide dismutase gene: Isolation, characterization and species comparison. Biochem Biophys Res Commun 1992;186:936-43.
82. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper, zinc superoxide dismutase in primary a cytosolic protein in human cell. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:10405-9.
83. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: A regulator of nitric oxide bioavailability. Lab Invest 1996;75:617-36.
84. Carlsson LM, Marklund SL, Edlund T. The rat extracellular superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cell. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:5219-22.
85. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. FASEB J 1992;6:2675-83.
86. Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T. Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. Kidney Int 1994;45:1-9.
87. Maser RL, Magenheimer BS, Calvet JP. Mouse plasma glutathione peroxidase.cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion. J Biol Chem 1994;269:27066-73.
88. Arthur JR, Beckett GJ. Newer aspects of micronutrients in at risk groups. New metabolic roles for selenium. Proc Nutr Soc 1994;53:615-24.
89. Avissar NS, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. Am J Physiol 1994;266:C367-75.
90. Yoshimura S, Watanabe K, Suezumi H, Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T. Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. J Biochem 1991;109:918-23.
91. Bergelius-Flohé R, Aumann KD, Blöcker H, Gross G, Kiess M, Klöppel KD, Malorino M, Ringer A, Schuckelt R, Ursini F, Wingender E, Flohé L. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA and deduced aminoacid sequence. J Biol Chem 1994;269:7342-8.
92. Pushpa-Rekha TR, Burdsall AL, Oleksa LM, Chisolm GM, Driscoll DM. Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase.cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. J Biol Chem 1995;270:26993-9.

93. Spallholz JE. Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system. En: Antioxidants nutrients and Immune Functions. Bendich A, Phillips M, Tengerdy RP (Eds) Plenum Publishing Corporation 1990.
94. Aebi HE. Catalase. En: Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie, Weinheim 1982.
95. Price VED, Sterling WR, Tarrant VA, Hartley RW, Reckitt M. The kinetics of catalase synthesis and destruction *in vivo*. J Biol Chem 1962;237:3468-75.
96. Aebi HE. Catalase *in vitro*. Meth Enzymol 1984;105:121-6.
97. Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H. Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. Gene 1989;79:279-88.
98. Liebler DC. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. Crit Rev Toxicol 1993;23:147-69.
99. Mc Donald LJ, Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. Proc Soc Exp Biol Med 1996;211:1-6.
100. Singh SV, Mack LM, Xia H, Srivastava SK, Hu X, Benson PJ, Murthy M, Mc Fadden E, Gupta V, Zaren HA. Differential induction of glutathione redox-enzymes by the anticarcinogenic organo sulfides from garlic. Clin Chem Enzymol Comms 1997;7:287-97.
101. Grune T, Scherdt H, Brennd H, Conradi E, Brenke R, Siems W. Influence of *Allium sativum* on oxidative stress status. Phytomedicine 1996;2:205-7.
102. Lau BH. Suppression of LDL oxidation by garlic. J Nutr 2001;131:985S-8S.
103. Phelps S, Harris WS. Garlic supplementation and lipoprotein oxidation susceptibility. Lipids 1993;28:475-7.
104. Simons LA, Balasubramaniam S, Konigsmark M. On the effect of garlic on plasma lipids and lipoproteins in mild hypercholesterolaemia. Atherosclerosis 1995;113:219-25.
105. Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MA, Hernández Pando R, Ibarra Rubio ME. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity relation to antioxidant enzymes. Free Radic Biol Med 2000;29:602-11.
106. Iqbal M, Athar M. Attenuation of iron nitrilotriacetate (Fe-NTA) mediated renal oxidative stress, toxicity and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of rats with garlic oil. Food Chem Toxicol 1998;36:485-95.
107. Helen A, Rajasree CR, Krishnakumar D, Augusti KT, Vijayammal PL. Antioxidant role of oils isolated from garlic (*Allium sativum* Linn) and onion (*Allium cepa* Linn) on nicotine-induced lipid peroxidation. Vet Hum Toxicol 1999;41:316-9.
108. Kojima R, Toyama Y, Ohnishi T. Protective effects of an aged garlic extract on doxorubicin-induced cardiotoxicity in the mouse. Nutr Cancer 1994;22:163-73
109. Numagami Y, Sato S, Ohnishi ST. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts a possible protecting mechanism as antioxidants. Neurochem Int 1996;29:135-43.
110. Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress. Enviado a Life Sciences. Dic 2002. Manuscrito número LS-0870-02.
111. Numagami Y, Ohnishi ST. S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia J Nutr 2001;131:1100S-5S.
112. Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin induced oxidative stress and renal damage. Enviado a Free Radic Biol Med, 2003.
113. Nakagawa S, Kasuga S, Matsuura H. Prevention of liver damage by aged garlic extract and its components in mice. Phytother Res 1988;1:1-4.
114. Mostafa MG, Mima T, Ohnishi ST, Mori K. S-allylcysteine ameliorates doxorubicin toxicity in the heart and liver in mice. Planta Med 2000;66:148-51.
115. Sumioka I, Marsura T, Kasuga S, Itakura Y, Yamada K. Mechanisms of protection by S-allylmercaptocysteine against acetaminophen-induced liver injury in mice. Jpn J Pharmacol 1998;78:199-207.

116. Batirel HF, Naka Y, Kayano K, Okada K, Vural K, Pinsky DJ, Oz MC. Intravenous allicin improves pulmonary blood flow after ischemia-reperfusion injury in rats. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2002;43:175-9.
117. Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Barrera D, Cerón A, Medina-Campos Omar N, and Hernández Pando R. Protective effect of diallyl sulfide on oxidative stress and nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. *Enviado a Molecular and Cellular Biochemistry, Dic 2002.*
118. Pedraza-Chaverri J, González-Orozco AE, Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R. Diallyl disulfide ameliorates gentamicin-induced oxidative stress and acute renal failure. *Enviado a Biochemical Pharmacology, Dic 2002. MS# 252-1003-3*
119. Ide N, Lau BH. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced. *J Pharm Pharmacol* 1997;49:908-11.
120. Ide N, Lau BH. S-allylcysteine attenuates oxidative stress in endothelial cells. *Drug Dev Ind Pharm* 1999;25:619-24.
121. Ho SE, Ide N, Lau BH. S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine* 2001;8:39-46.
122. Hikino H, Tohkin M, Kiso Y, Namiki T, Nishimura S, Takeyama K. Anthepatotoxic actions of *Allium sativum* bulbs. *Planta Med* 1986;3:163-8.
123. Wei Z, Lau BH. Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutr Res* 1998;18:61-70.
124. Wang BH, Zuzel KA, Rahman K, Billington D. Protective effects of aged extract against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices. *Toxicology* 1998;126:213-22.
125. Wang BH, Zuzel KA, Rahman K, Billington. Treatment with aged garlic extract protects against bromobenzene toxicity cut rat liver slices. *Toxicology* 1999;132:215-25.
126. Yang GC, Yasaei MP, Page SW. Garlic as antioxidant and free radical scavenger. *J Food Drug Anal* 1993;1:357-64.
127. Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic. *Mol Cell Biochem* 1996;154:55-63.
128. Kim KM, Chun SB, Koo MS, Choi WJ, Kim TW, Kwon YG, Chung HT, Billar TR, Kim YM. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic Biol Med* 2001;30:747-56.
129. Yin MC y Cheng WS. Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices. *J Food Prot* 1998;61:123-5.
130. Lewin G, Popov I. antioxidant effects of aqueous extract. 2nd communication: Inhibition of the Cu²⁺ initiated oxidation of low density lipoproteins. *Arzneimittelforschung* 1994;44:604-7.
131. Torok B, Belagyi J, Rietz B, Jacob R. Effectiveness of garlic on the radical activity in radical generating systems. *Arzneimittelforschung* 1994;44:608-11.
132. Siegers CP, Robke A, Pentz R. Effects of garlic preparations on superoxide production by phorbol ester activated granulocytes. *Phytomedicine* 1999;6:13-6.
133. Yamasaki T, Li L, Lau BH. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Phytother Res* 1994;8:408-12.
134. Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* 1994;60:417-20.
135. Ide N, Nelson AB, Lau BH. Aged garlic extract and its constituents inhibit Cu²⁺-induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Med* 1997;63:263-4.
136. Geng Z, Lau BH. Aged garlic extract modulates glutathione redox cycle and superoxide dismutase activity in vascular endothelial cells. *Phytother Res* 1997;11:54-6.
137. Ide N, Matsuura H, Itakura Y. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother Res* 1996;10:340-1.
138. Prasad D, Laxdal VA, Yu M, Raney BL. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Mol Cell Biochem* 1995;148:183-9.

139. Kourounakis PN, Rekka EA. Effect on active oxygen species of alliin and Allium sativum (garlic) powder. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1991;74:249-52.
<http://www.ssa.gob.mx/>
140. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanism. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995;91:2488-96.
141. Navab M, Fogelman AM, Verliner JA, Territo MC, Demer LL, Frank JS, Watson AD, Edwards PA, Lusis AJ. Pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995;76:18C-23.
142. Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Etayo JC, Diez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000;35:1055-61.
143. Pettit AI, Wong RK, Lee V, Jennings S, Quinn PA, Ng LL. Increased free radical production in hypertension due to increased expression of the NADPH oxidase subunit p22(phox) in lymphoblast cell lines. *J Hypertens* 2002;20:677-83.
144. Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NADPH oxidase. *Hypertension* 2001;38:1395-9.
145. Mathew TH. Drug-induced renal disease. *Med J Aust* 1992;156:724-8.
146. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* 2001;131:1010S-5S.
147. Block E. Introduction and overview of the chemistry and medicinal properties of garlic. Presentación en el taller: "Mechanistic studies of cardiovascular effects of botanicals." Bethesda, MD 2002;23. <http://ods.od.nih.gov/news/conferences/botanical.html>.
148. Pedraza-Chavemí J, Medina-Campos ON, Granados-Silvestre MA, Maldonado PD, Olivares-Corichi IM, Hernández-Pardo R. Garlic ameliorates hyperlipidemia in chronic aminonucleoside nephrosis. *Mol Cell Biochem* 2000;211:69-77.
149. Pedraza-Chavemí J, Granados-Silvestre MD, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Olivares-Corichi IM, Ibarra-Rubio ME. Post-transcriptional control of catalase expression in garlic-treated rats. *Mol Cell Biochem* 2001;216:9-19.
150. Pérez García V. Efecto del dialil trisulfuro en la insuficiencia renal aguda experimental. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 2002.
151. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1287-312.
152. Diez-Fernández C, Sanz N, Cascales M. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme gene expression in acute hepatic injury induced by thiacetamide. *Biochem Pharmacol* 1996;51:1159-63.
153. Ursini MV, Parrella A, Rosa G, Salzano S, Martini G. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. *Biochem J* 1997;323:801-6.
154. Barone FE, Tansley MR. Isolation, purification, identification, synthesis, and kinetics of activity of the anticandidal component of Allium sativum, and a hypothesis for its mode of action. *Mycologia* 1977;69:793-825.
155. Owen PL, Johns T. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *J Ethnopharmacol* 1999;64:149-60.
156. McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1968;243:5753-60.
157. Kolbeck RC, She ZW, Callahan LA, Nosek TM. Increased superoxide production during fatigue in the perfused rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:140-5.
158. Nishikimi M, Appaji N, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972;46:849-54.
159. Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Reactive oxygen species in puromycin aminonucleoside nephrosis: *in vitro* studies. *Kidney Int* 1994;45:1057-69.
160. Cohen G. An acetaldehyde artifact in studies of the interaction of ethanol with biogenic amine systems: the oxidation of ethanol by ascorbic acid. *J Neurochem* 1977;29:761-2.

162. Ohkawa H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
163. Posadas-Sanchez R, Posadas-Romero C, Zamora-Gonzalez J, Hernandez-Ono A, Banos-Martinez G, Campos ON, Pedraza-Chaverri J. LDL size and susceptibility to oxidation in experimental nephrosis. *Mol Cell Biochem* 2001;220:61-8.
164. Ford DM, Thieme RE, Lamp CA, Covington SJ, Molitoris BA. HWA-448 reduces gentamicin toxicity in LLC-PK1 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274:29-33.
165. Saito H, Inui K, Hori R. Mechanisms of gentamicin transport in kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J Pharmacol Exp Ther* 1986;238:1071-6.