

00528
3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

EFEECTO DE DOS EXTRACTOS ACUOSOS DEL AJO SOBRE
LA OXIDACION DE LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD
EN EL SUERO HUMANO



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
MARIA GABRIELA ALBARRAN MORAN

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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Ángela Sotelo López
Vocal	Prof. Lucía Gabriela Bascañán Termini
Secretario	Prof. José Pedraza Chaverri
1er suplente	Prof. Lucía Cornejo Barrera
2do. Suplente	Prof. Rosa María Argote Espinoza

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Bioquímica Clínica 209, Departamento de Biología, Edificio B.
Facultad de Química, UNAM, México D.F.

Este trabajo de investigación recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencias y
Tecnología (Proyecto No. 40009 M).

Asesor: Dr. José Pedraza Chaverri
Sustentante: María Gabriela Albarrán Morán

Pedraza

Emy

... Dirección General de Bibliotecas de la
... situadas en formato electrónico e impreso en
... onido de mi trabajo personal.
NOMBRE: María Gabriela
Albarrán Morán
FECHA: 27 octubre 2003
... Emy

B

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

Esta tesis fue apoyada por el proyecto: 40009-M de CONACYT

C

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de estar viva y sana, por darme la fortaleza y la fe para vivir el solo por hoy todos los días de mi vida.

A mis papás, Ricardo y Tere, por su amor, apoyo y ayuda que he recibido a lo largo de toda mi vida. Guardo en mi corazón todas las lecciones de vida aprendidas por ustedes. Los quiero muchísimo.

A mi gran amor, Víctor Manuel, por tu cariño incondicional, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por compartir junto a mí esta aventura. Eres parte esencial en mi vida. Te amo

A mis hermanos, Riqui y Luis, por todos los momentos juntos, por tantas horas compartidas y por tantos sueños vividos juntos. Los quiero mucho.

A Rocío Sanchez, mi hermanita, por tu amistad y cariño, gracias por todo tu apoyo cuñis, por transmitirme tanta fortaleza. Te quiero mucho.

A mi otra familia, Víctor, Martis, Rocío y Rafa, por apoyarme y quererme. Por compartir conmigo su vida, son una parte muy importante en la mía, los quiero muchísimo.

A mi asesor y amigo, Dr. José Pedraza Chaverri, por su apoyo y cariño, por regalarme tantas horas, gracias por su confianza.

A mi adorado grupo, por recibirme con los brazos abiertos a cualquier hora, le agradezco a Dios haberme llevado ahí.

A mis amigas, Sarita, Marta, Paty y Bertha por su amor incondicional, las quiero.

A mis tíos adorados, Alberto y María Cristina, por su amor, por compartir su vida conmigo, los quiero mucho y son un ejemplo para mí.

A Alejandra, mi gran amiga, mi hermana, por todos los momentos compartidos juntas, te extraño mucho nena, siempre estás en mi corazón.

A Itza, por ser mi gran amiga, por tu amistad y cariño, por estar juntas apoyándonos en momentos tan importantes, te quiero mucho pig.

A José Juan mi mejor amigo, por tantas y tantas horas dedicadas a filosofar sobre la vida. Te quiero muchísimo amigo.

A Delfina, Areli y José Luis por formar parte de mi vida, por su apoyo y amor. Mil gracias

A Mariana y Laura por su amistad y apoyo, gracias por compartir conmigo un cachito de su corazón. A mis amigos, Rulo, Alex, Cesi, Dorita, Anita y Efra por hacer de mi vida en la facultad un lugar súper lindo, los quiero.

Al laboratorio 209, Irasema, Lety, Omar, Perla, Diana, Ross, Marco. Gracias por su amistad y apoyo.

A mi amiga y doctora, Lupita Aguila, por su amistad y cariño. Gracias por tantas horas dedicadas a mí. Te quiero mucho.

A mi adorada Universidad.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 QUÍMICA DEL AJO	3
2.1.2 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL AJO	8
2.1.3 METABOLISMO DEL AJO	10
2.1.4 RESUMEN DE LA EVIDENCIA DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS DEL AJO	14
2.2 LIPOPROTEINAS	16
2.2.1 ESTRUCTURA DE LAS LIPOPROTEINAS	16
2.2.2 LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD	17
2.3 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA	20
3. OBJETIVOS	23
4. HIPÓTESIS	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 MATERIALES	24
5.1.1 REACTIVOS	24
5.1.2 SOLUCIONES	24
5.1.3 EQUIPO	25
5.2 MÉTODOS	26
5.2.1 DIAGRAMA DE FLUJO	26
5.2.2 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DEL AJO	27
5.2.3 OBTENCIÓN DEL SUERO	28
5.2.4 OXIDACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS DEL SUERO	28
5.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
6. RESULTADOS	31
6.1 DATOS DE LOS SUJETOS HUMANOS A PARTIR DE LOS CUALES SE OBTUVO EL SUERO	31
6.2 EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE AJO EN POLVO SOBRE LA OXIDACIÓN DE LAS LDL	31

F

6.3 EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE DIENTE DE AJO SOBRE LA OXIDACIÓN DE LAS LDL	36
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
8. CONCLUSIONES	46
9. PERSPECTIVAS	47
10. BIBLIOGRAFÍA	48

RESUMEN

En el presente estudio se estableció la técnica para estudiar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el suero completo de humanos. Así mismo, se evaluó el efecto de los extractos acuosos de polvo de ajo y de diente de ajo sobre la oxidación de las LDL en el suero de cinco sujetos humanos. A su vez se evaluó si el calentamiento podría afectar su capacidad antioxidante.

Las condiciones obtenidas de la técnica fueron las adecuadas para poder medir la cinética de oxidación de las LDL. El método que se utilizó fue espectrofotométrico. Se siguió la cinética de oxidación mediante lecturas a 234 nm para seguir la formación de dienos conjugados formados por la oxidación *in vitro* de las LDL con Cu^{2+} . Se demostró que estos extractos inhiben la oxidación *in vitro* de las LDL de una manera dependiente de la concentración, a su vez se observó que la capacidad antioxidante de estos extractos acuosos no se afecta al calentarlos por 20 minutos a ebullición por lo que se pueden recomendar para su consumo, como un ingrediente benéfico aparte de aportar un buen sabor a los alimentos.

H

1) INTRODUCCIÓN

Se plantea un proyecto para estudiar de manera comparativa los efectos antioxidantes que tienen distintos extractos acuosos de ajo sobre la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el suero humano. Así, la información que se obtenga permitirá reconocer si el ajo, que normalmente se consume en casa con los alimentos, tiene propiedades antioxidantes, lo que permitirá recomendarlo ampliamente para su consumo por sus propiedades benéficas.

Las enfermedades cardiovasculares son uno de los padecimientos más serios que la población mundial actual sufre. En años anteriores se han hecho estudios tanto en animales como en humanos donde existe una fuerte evidencia de que el ajo posiblemente reduce la incidencia de enfermedades cardiovasculares.¹ 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.²

En las dos últimas décadas se ha hecho una fuerte asociación entre la elevada cantidad de LDL en el suero humano, y el desarrollo de la aterosclerosis.¹ Se cree que la oxidación de las LDL es un proceso crítico en su desarrollo. La presencia de LDL oxidada en la íntima de una arteria lleva a la producción de células espumosas derivadas de macrófagos.³ Estas células se colocan en la capa externa del endotelio del vaso e inician la primera etapa de la aterosclerosis.

Se ha demostrado que el ajo posee actividad antioxidante y en estudios con humanos que incrementa la resistencia a la oxidación de las LDL.¹

Para observar la capacidad antioxidante de las diferentes preparaciones del ajo, se presenta un modelo experimental *in vitro* en el cual se obtienen datos reproducibles y confiables. Se pretende observar la resistencia que tienen las LDL al ser oxidadas, por las diferentes presentaciones del ajo.

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 LDL y no se conoce el o los componentes del ajo que son responsables de dichos efectos.^{4, 4a}

Se tendrán como objetivos el comparar la actividad antioxidante, *in vitro*, de polvo y dientes de ajo sin calentar y sometidos a calentamiento. así mismo, se analizará si se puede recomendar estos productos, como sustancias benéficas aparte de aportar un buen sabor a los alimentos, por lo cual se elevará la importancia de difundir entre la población su consumo. Se ha visto que en el diente entero no se encuentran todos los compuestos antioxidantes y que al cortar, triturar o bien masticar el ajo, se obtienen los tiosulfínatos (alicina) los cuales tienen un efecto antioxidante.⁵ Es así como este efecto natural de los compuestos del ajo, es de sumo interés práctico ya que podría explicar algunos de sus efectos terapéuticos, como es en el caso de la aterosclerosis.

2) ANTECEDENTES

2.1 QUÍMICA DEL AJO

El ajo pertenece a la familia *Alliace*, 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. El ajo ocupa un lugar importantísimo en la historia culinaria, así como en la medicina popular y creencias de casi todas las religiones.⁵

El valor medicinal del ajo ha sido reconocido por siglos. Recientemente se han empezado a hacer investigaciones para dilucidar los mecanismos por los que se tiene estos efectos benéficos en el tratamiento de varias enfermedades. Mas aún, se le han atribuido varias propiedades terapéuticas como antimicrobiano, cardioprotector, inmunosupresor y antioxidante, entre otras.⁶

Fuertes evidencias han sugerido que muchas de estas propiedades benéficas se pueden atribuir a constituyentes específicos encontrados en el ajo y sus extractos. Estos estudios involucran un análisis químico del ajo, el cual sugiere que los compuestos organosulfurados son responsables de su bioactividad.⁷

Así es que la gran mayoría de las investigaciones analíticas y farmacológicas del ajo están enfocadas a sus compuestos con azufre y organosulfurados.^{3,4} Esto se puede deber no solo por su alta abundancia en el ajo (11-35 mg/g ajo fresco), sino también estos compuestos son los únicos compuestos conocidos en el ajo, que tienen actividad farmacológica a dosis que representan los niveles típicos de consumo de ajo (tabla 1).

Tabla 1. Composición química de los dientes de ajo (mg/g peso fresco)^{3,4}

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-alquencil cisteínas	0.01-0.03	Sodio	0.11
Escordininas	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
Acidos fenólicos	0.04	Azufre	2.3-3.7
Acido fítico	0.8	Nitrógeno	6-13

El compuesto organosulfurado más abundante en el ajo es la alina, (sulfóxido de S-ailil cisteína), la cual está a una concentración de 10 mg/g del ajo fresco ó 30 mg/g del extracto de ajo seco (en polvo). Cuando el ajo fresco es machacado, cortado o restituido, (en el caso de que se tenga ajo en polvo y se humedezca en un ambiente no ácido), los sulfóxidos de cisteína, los cuales son inodoros e insolubles en solventes orgánicos, son convertidos rápidamente en nuevas clases de compuestos, los

orgánicos, son convertidos rápidamente en nuevas clases de compuestos. los tiosulfatos. Estos son mas solubles en solventes orgánicos que en el agua y son volátiles, lo que los hace responsables del olor a ajo. La formación de tiosulfatos toma lugar cuando la alicina se pone en contacto con la alinasa para formar alicina. La alinasa es una glicoproteína de PM de 55,000 Da, la cual requiere de piridoxal fosfato y es inhibida a pH por debajo de 3.5 y por cocimiento.^{3,4,5}

Se ha postulado que la alicina es uno de los compuestos responsables del efecto de la disminución de lípidos en suero. La evidencia de esto es baja ya que se sabe que los tiosulfatos son de naturaleza inestable y tienen gusto fuerte, por lo que todavía no se ha empleado en forma pura en estudios en humanos.⁵

Las enfermedades cardiovasculares son una de las enfermedades mas serias que la población mundial actual sufre, en las dos últimas décadas se ha hecho una fuerte asociación entre la elevada cantidad de las LDL en el suero humano y el desarrollo de la aterosclerosis. Recientemente se ha demostrado que la oxidación de las LDL contribuye a la iniciación y progresión de la misma.¹

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.^{4,5}

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 caldo de frijol es calentada, la alicina no se pierde, pero cuando el aceite y el caldo de frijol son omitidos de la mezcla, la alicina se pierde y 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.⁶

En la Fig. 1 se muestran las diferentes transformaciones en composición que sufre el ajo dependiendo del tratamiento al que sea sometido.⁹

2.1.2 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL AJO

Los compuestos del ajo inhiben la formación de radicales libres, apoyan los mecanismos endógenos de atrapar radicales libres y protegen contra la oxidación de las LDL.¹

Se han hecho revisiones acerca de los efectos farmacológicos de los dientes de ajo y sus productos, en las cuales se presentan evidencia para cada efecto farmacológico del ajo, y se aclara que el principal compuesto activo para dicho efecto está en discusión. Es importante notar que la expresión de "compuesto activo" no necesariamente significa que el compuesto considerado es el que causa el efecto en el sitio de acción, pero es necesaria su presencia al inicio para obtener dicho efecto. Esta distinción es necesaria ya que el destino metabólico de los compuestos del ajo, como en muchas otras plantas, es desconocido.⁵

Al someter las preparaciones comerciales del ajo (ajo en polvo), o bien el diente de ajo sometido a altas temperaturas, las propiedades antioxidantes de los mismos podrían cambiar, ya que algunos de sus componentes sufren transformaciones durante estos tratamientos.⁴

El ajo se consume frecuentemente cocinado y no se sabe si éste proceso disminuye su actividad antioxidante. Existen evidencias que indican que el extracto de ajo es un poderoso atrapador de radical hidroxilo y que el tratamiento por calor reduce su actividad levemente.¹⁰ Una evaluación de la habilidad del extracto de ajo de prevenir la

oxidación de LDL en suero sería un importante paso para el entendimiento del mecanismo de los efectos benéficos del ajo sobre enfermedades cardiovasculares.

Es importante recalcar que no se ha estudiado si el calentamiento de los extractos acuosos del ajo altera su capacidad para inhibir la oxidación de las LDL y no se conoce el o los componentes del ajo que son responsables de dichos efectos.⁴

Para investigar la susceptibilidad a la oxidación de las LDL en el suero, se enfrentan a estímulos pro-oxidantes. El método experimental proporciona la formación de dienos conjugados de los ácidos grasos de las lipoproteínas del suero expuestas al Cu^{2+} , valoradas por cambios en la absorbencia a 234 nm por un tiempo de 4 h con intervalos de 10 min a 37°C.¹¹

Se ha encontrado que el extracto de ajo envejecido (AGE), tiene la capacidad para quelar el Cu^{2+} , esto conlleva a estudiar el mecanismo por el cual el extracto de ajo fresco inhibe la oxidación de las LDL en el suero.

Aunque existe una pequeña evidencia para el hecho de que el Cu^{2+} tiene un papel importante en la modificación de las LDL *in vivo*, se ha demostrado que las lesiones ateroscleróticas contienen cantidades detectables de Cu^{2+} reactivo. Este Cu^{2+} catalítico y otros metales divalentes como el Fe^{2+} , pueden contribuir al ambiente pro-oxidante de la lesión aterosclerótica cuando tiene lugar la oxidación extensa de las LDL.

La habilidad de los extractos de plantas para quelar iones divalentes puede reducir sus efectos pro-oxidantes y esto puede ser uno de los mecanismos por el cual el AGE y otros extractos de plantas pueden actuar como agentes oxidantes *in vivo*. También se

ha reportado que las LDL aisladas de sujetos que consumieron AGE u otros extractos de plantas, tuvieron una menor susceptibilidad a la oxidación *in vitro*. Estas observaciones sugieren que los compuestos activos presentes en estos extractos continúan siéndolo después de la ingestión, entrando a la circulación donde pueden ejercer su efecto antioxidante bloqueando la oxidación de las LDL y/o interactuando con antioxidantes endógenos.¹²

2.1.3 METABOLISMO DEL AJO

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 responsables de su efecto terapéutico en células objetivas, 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.⁵

Sin embargo, se sabe que la alicina se absorbe muy bien, indicado esto por un olor persistente en el aliento, piel o líquido amniótico en las personas después del consumo del ajo crudo o fresco.¹³

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.¹⁴

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. 2 se muestran las posibles vías de metabolismo de los principales compuestos del ajo en el cuerpo humano.⁵

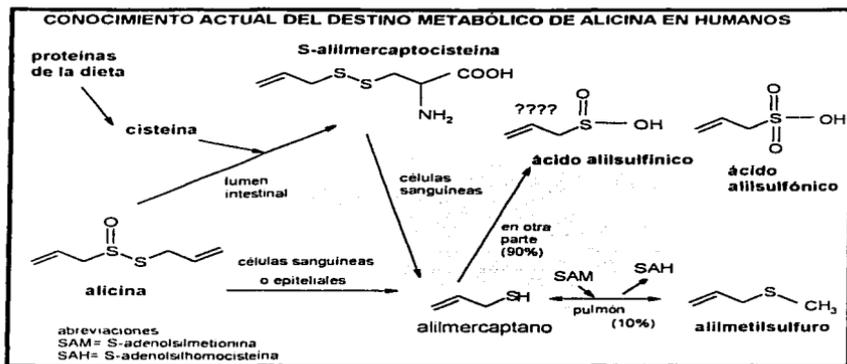


Figura 2. Conocimiento actual del destino metabólico de alicina en humanos.⁵

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)¹⁵, 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 alil metil sulfuros

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

(AMS) y de DADS (Dialil Sulfuros) en cantidades mucho menores en el aliento después del consumo de ajo.^{16,17}

En sangre humana entera, la alicina es metabolizada rápidamente por las células sanguíneas a alil mercaptano (alil-SH).^{15,18} Esto también parece ocurrir en las células epiteliales de la garganta, ya que el consumo del ajo triturado resulta casi de inmediato, en 15 segundos, en presencia de alil-SH en el aliento.^{16,19}

Sin embargo, es probable que el alil-SH no sea el único metabolito de la alicina, ya que éste es un compuesto altamente oloroso y no se ha encontrado en determinaciones cuantitativas en sangre, heces y orina. 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 aliilsulfínico (ácido 2-propensulfínico) o ácido aliilsulfónico (2-propensulfónico).⁴

Esta propuesta se basa en el hecho de que la cisteína, la cual tiene un grupo tiol, es metabolizada en el cuerpo a β -sulfínilpiruvato (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 oxidado¹⁴, y que la alicina se metaboliza a los dialil sulfuros los cuales se transforman completamente en la ratas a sus productos oxigenados, el dialil sulfóxido (DASO) y la dialil sulfona (DASO₂).²⁰

En la tabla 2 se muestra el destino final de la alicina y de sus derivados en sangre.

Tabla 2. Destino final de la alicina y de sus compuestos derivados en sangre^{a,5}

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)
Dialiltrisulfuro	4	Alil-SH
Dialildisulfuro	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^{15,16}

NR (<10 reduce en 2 h).

Muchos de los productos de transformación de la alicina están presentes en los aceites comerciales del ajo, y también son metabolizados inicialmente a alil-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^{15,21,22}, 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 -glutamyl-S-alqueniil cisteínas son

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

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.⁴

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.²³ 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.²⁴

2.1.4 RESUMEN DE LA EVIDENCIA DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS DEL AJO

Hasta aquí se ha 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 tiosulfatos y se forman al cortar y/o triturar un diente de ajo y se asocia más con las actividades antioxidantes, anti-trombóticas y antimicrobianas que otros tiosulfatos.^{25,15} Existen fuertes evidencias que indican que los tiosulfatos son responsables de los efectos antimicrobianos e hipolipidémico/hipocolesterolemiantes del ajo, y también parecen ser los responsables de los efectos antioxidantes e hipoglucémicos; además de

los efectos anticancerígenos y de estimulación inmune, pero no hay evidencia de que posea efecto hipotensivo (tabla 3).

Tabla 3. Resumen de los principales compuestos esenciales de los dientes de ajo y sus efectos farmacológicos en los niveles normales de consumo.

EFEECTO	MUCHAS EVIDENCIAS	POCAS EVIDENCIAS
Antimicrobiano	Alicina/ tiosulfatos	
Hipolipidémico	Alicina/ tiosulfatos	
Hipotensivo	Desconocido (no tiosulfatos)	γ -glutamil cisteínas, fructanos
Antitrombótico	Alicina/ tiosulfatos	
Fibrinólisis	Alicina/ tiosulfatos	Cicloalina
Antioxidante	Alicina/ tiosulfatos	
Anticancerígeno	Desconocido y tiosulfatos	γ -glutamil cisteínas
Efectos en el sistema inmune	Desconocido y tiosulfatos	

Esto no quiere decir que todos los efectos del ajo se deban solamente a los tiosulfatos, 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

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

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.^{5,24}

2.2 LIPOPROTEÍNAS

La naturaleza hidrofóbica de los triglicéridos, fosfolípidos y colesterol, su demanda por las células del cuerpo, y la vía sanguínea por la que deben de llegar a ellas, hacen necesario un sistema complejo para transportarlos. Aún cuando moléculas simples, como los ácidos grasos, pueden ser transportados en el plasma en unión a albúmina, un mecanismo eficiente para el acarreo de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol debe ser capaz, no solo para transportar esas moléculas hidrofóbicas a través de un medio acuoso como es el plasma sanguíneo, sino que también debe asegurar su distribución a tejidos específicos en los que se requieren. La unión de estos elementos en combinación con algunas proteínas (apolipoproteínas) forman unidades conocidas como lipoproteínas, que satisfacen ambos requerimientos.²⁶

2.2.1 ESTRUCTURA DE LAS LIPOPROTEÍNAS

Las lipoproteínas plasmáticas son partículas constituidas por dos zonas principales. La primera se encuentra en la parte central de la molécula en donde encontramos lípidos no polares, es decir, triglicéridos y ésteres del colesterol, los cuales forman microemulsiones, siendo el elemento emulsificador un fosfolípido, generalmente lecitina

(fosfatidilcolina). La segunda región es anfipática, incluye moléculas como fosfolípidos y colesterol libre. Estas dos moléculas tienen una parte apolar y otra no cargada o que potencialmente puede adquirir carga. De esta manera alinean sus partes apolares junto a lípidos hacia el centro y las partes solubles hacia el ambiente acuoso de la sangre.²⁶

Las lipoproteínas poseen una o más clases de apolipoproteínas que tienen varias regiones helicoidales con propiedades anfipáticas, las cuales arreglan sus partes hidrófobas hacia el centro y sus partes hidrófilas hacia la parte externa, en contacto con el ambiente acuoso. Tienen tres funciones principales: actúan como elementos estructurales de las lipoproteínas; algunas apolipoproteínas son el sitio de reconocimiento de receptores celulares específicos para las lipoproteínas y otras poseen determinantes específicos que les permiten funcionar como cofactores de las enzimas que intervienen en el metabolismo de las lipoproteínas.

El resultado es una partícula que puede ser relativamente soluble en agua permitiendo el transporte de moléculas hidrófobas contenidas en su interior a través del plasma.^{26,27}

2.2.2 LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL)

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) tienen un diámetro de 20-22 nm. Están constituidas principalmente por ésteres de colesterol (35-45%), contienen un 22-26% de apolipoproteínas de las cuales más del 95% es Apo B-100. Su densidad está entre 1.019-1.063 g/ml. Son las lipoproteínas que más colesterol transportan en el plasma humano y constituyen la principal fuente de colesterol para las células, el cual puede ser

utilizado para la biosíntesis de membranas celulares, como precursor de ácidos biliares y hormonas esteroideas entre otros procesos biosintéticos.

La vía principal por la que el hígado y los tejidos periféricos depuran a las LDL del plasma, es a través de receptores específicos, los cuales reconocen y unen a la molécula de Apo B-100 presente en la superficie de las LDL.²⁸



Figura 3. Estructura de la LDL

A nivel sistémico los receptores de LDL cumplen con una segunda función que es crítica para el desarrollo de la aterosclerosis; remueven a las LDL del torrente sanguíneo. Estudios clínicos y experimentales han establecido que una concentración elevada de LDL en el plasma está asociada con una acelerada aterogénesis.¹⁹

Se ha inducido aterosclerosis en animales experimentales por medio de una dieta alta en grasas, con la que se elevan los niveles plasmáticos de colesterol. Estas dietas altas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en grasas y colesterol pueden elevar los niveles de LDL apareciendo poco a poco lesiones ateroscleróticas.²⁶

Hay poca información acerca de los efectos de la oxidación lipídica sobre la aterosclerosis en humanos. Se ha reportado en pacientes con enfermedades coronarias, un aumento en la concentración de lípidos oxidados en el plasma. Las LDL son protegidas de la oxidación por antioxidantes liposolubles como es el α -tocoferol y carotenos.²⁶

Más aun, hay una fuerte correlación entre el contenido de triglicéridos en las LDL y la oxidación del mismo, lo cual indica que las partículas de LDL enriquecidas con triglicéridos pueden ser aterogénicas porque son más propensas a la oxidación.³⁰

Con respecto al desarrollo de la aterosclerosis, actualmente se acepta que los radicales libres (RL) juegan un papel importante en la deposición del colesterol en las paredes de los vasos sanguíneos. En las arterias, los sustratos de los RL son los ácidos grasos insaturados de las LDL. Cuando las LDL son oxidadas, adquiere nuevas propiedades que se encontraban ausentes en las LDL nativas.¹

La generación de un exceso de radicales libres está implicada en el aumento de enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades neurodegenerativas. Se ha investigado que existe un balance entre los efectos adversos ocasionados por los radicales libres y la complementación del sistema antioxidante endógeno con consumo de antioxidantes en la dieta.¹⁴

Las LDL oxidadas (LDL-ox) adquieren propiedades antigénicas que son reconocidas por el sistema inmune como extrañas y esto conlleva a nuevas respuestas biológicas.

En resumen, el daño oxidativo es acompañado por la pérdida de su función normal, ya que las LDL-ox 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.¹

2.3 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Se plantea un proyecto para estudiar de manera comparativa los efectos antioxidantes que tienen distintas presentaciones del ajo al ser sometidas al calor. Así, la información que se obtenga permitirá reconocer si el ajo que normalmente se consume en casa con los alimentos, tiene propiedades antioxidantes, lo que permitirá recomendarlo ampliamente para su consumo por sus propiedades benéficas.

La pro-oxidación lipídica es iniciada por un ataque de radicales libres sobre dobles enlaces de los ácidos grasos.³⁰ Los dienos conjugados son formados (-CH=CH-CH=CH-), los cuales absorben la luz ultravioleta en un rango de longitud de onda de 230-235 nm. Muchos de estos son convertidos en hidroxiperóxidos lipídicos y otras moléculas reactivas, como lo son los aldehídos. El aumento de investigaciones que implican a la peroxidación lipídica como un factor patogénico en distintos tipos de

enfermedades humanas, ha hecho importante el desarrollo de métodos que permitan la cuantificación de la misma.³⁰

Uno de ellos es analizar la susceptibilidad a la oxidación por la formación de dienos conjugados en LDL expuestas al Cu^{2+} *in vitro*. Se ha investigado la posibilidad de monitorear la formación de dienos conjugados de las lipoproteínas directamente en el suero. En lo que se refiere a la cinética de formación de dienos conjugados de las LDL, existen tres fases: fase de latencia, fase de propagación y fase de descomposición.³⁰

Durante la fase de latencia el α -tocoferol (el cual es un antioxidante liposoluble asociado a las LDL) y otros antioxidantes contenidos en el suero son consumidos de una manera dependiente del tiempo.³⁰

La fase de latencia es definida como la intersección entre la tangente de la pendiente de la fase de propagación con la línea base y está expresada en minutos.

La fase de propagación es la que se refiere a la formación de dienos conjugados, producto de la oxidación de los ácidos grasos de las LDL con Cu^{2+} . La fase de descomposición sugiere la descomposición de los dienos conjugados y la formación de nuevos compuestos como aldehídos y otras moléculas.³⁰

Por otro lado Regnstrom et. al han indicado mediante un estudio, el importante papel que juegan las LDL para sobre la formación de dienos conjugados y por tanto, la determinación de la fase de latencia en el suero. Este estudio se basó en el hecho de comparar las fases de latencia de las diferentes fracciones de lipoproteínas en el suero (VLDL, IDL, LDL y HDL).³⁰

Se parte de que el suero control no presentaba fracciones lipoproteicas y su fase de latencia era 119 min. Al agregarle las fracciones de lipoproteínas: HDL, VLDL e IDL, se presentó una fase de latencia muy similar a la del control. Por otro lado, al agregar LDL, VLDL y HDL la fase de latencia disminuyó a la mitad con respecto al suero control (77.3 min vs 119 min).³⁰

Estos resultados indican que las LDL juegan un papel importante en la formación de dienos conjugados en el suero humano.

Este método tiene algunas ventajas ya que sólo requiere la dilución del suero (0.67% en PBS) y la adición del CuSO_4 antes del análisis espectrofotométrico, el cual requiere muy pequeños volúmenes, y permite una determinación precisa de la individual susceptibilidad a la oxidación de cada suero. Más aún, no puede ser excluido que la relativa capacidad sea distorsionada debido a la dilución del suero.³⁰

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la habilidad del Cu^{2+} para promover la oxidación de las LDL ya que ha sido la manera más común de iniciar la oxidación de las LDL *in vitro*.³¹ Algunos de mecanismos citados son:

- ❖ Interacciones entre los iones del cobre y los hidroxiperóxidos lipídicos.
- ❖ Modulación de la lipoperoxidación por α -tocoferol.
- ❖ Autooxidación y formación del radical hidroxilo

3) OBJETIVOS

- Establecer la técnica para estudiar la oxidación de las LDL en el suero humano completo.
- Medir la actividad antioxidante *in vitro* de extractos acuosos de polvo de ajo y dientes de ajo.
- Evaluar si el calentamiento a ebullición por 20 minutos afecta la capacidad antioxidante de estos extractos.
- Analizar si se pueden recomendar estos extractos del ajo como ingredientes benéficos aparte de aportar un buen sabor a los alimentos.

4) HIPÓTESIS

- Los extractos acuosos de polvo de ajo y diente de ajo inhibirán *in vitro* la oxidación de las LDL del suero humano, inducida por Cu^{2+} .
- Las propiedades antioxidantes de estos extractos del ajo no se afectarán por el calentamiento a ebullición por 20 minutos.

5) MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1. REACTIVOS

Reactivo	Catálogo	Almacenamiento	Peso Molecular
CuSO ₄	Baker 19343	Temp. ambiente	249.686 g/mol
KH ₂ PO ₄	Baker 3246-01	Temp. ambiente	136.09 g/mol
Na ₂ HPO ₄	Baker 3828-05	Temp. ambiente	141.96 g/mol
H ₂ O destilada y purificada		Temp. ambiente	18 g/mol

5.1.2 SOLUCIONES

❖ Amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.4

Reactivo	250 ml
KH ₂ PO ₄	0.421 g
Na ₂ HPO ₄	0.270 g

Para este cálculo se usa la ecuación de Henderson Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log(\text{Base/Acido})$$

❖ CuSO₄ 1 mM

Reactivo	50 ml
CuSO ₄	12.48 mg

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

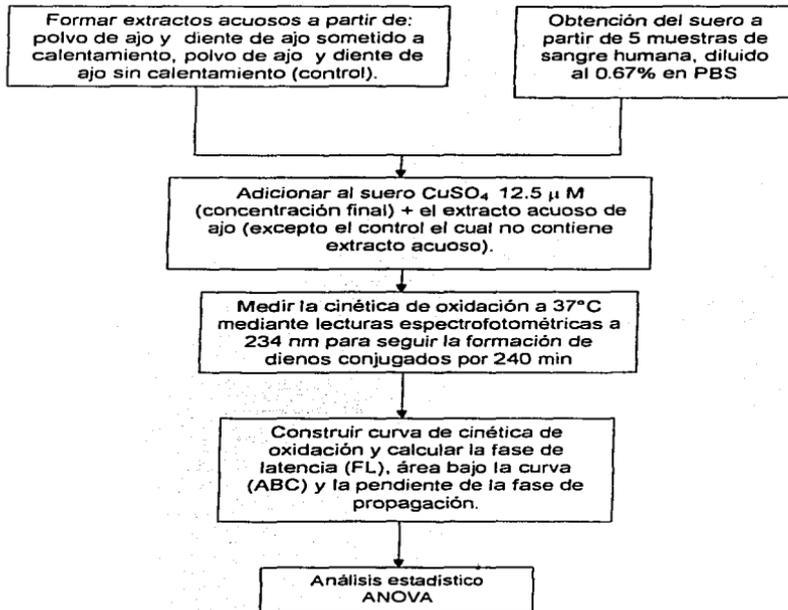
5.1.3 EQUIPO

NOMBRE	MARCA	CATALOGO	MODELO	# SERIE
AGITADOR MAGNÉTICO C/5 LUGARES	COLE PARMER		51450-70	979961140847
BALANZA ANALÍTICA ELECTRONICA	OHAUS		GA-110	2476
BALANZA GRANATARIA CENTRIFUGA DE MESA REFRIGERADA	OHAUS BECKMAN		TRIPLE BEAM MICROFUGE "R"	700800
COMPUT. PAVILION 7941 (BOCINAS)	HEWLETT PACKARD (POLK AUDIO)			
CONGELADOR -80°C	REVCO		ULT1786-7-D12	N12F-288848- NF
ESCANER SCANJET 2200C	HEWLETT PACKARD		SCANJET 2200C (C8500A)	CN157180G8
ESPECTROFOTOMETRO DU-64	BECKMAN		DU-64	4294845
ESPECTROFOTOMETRO DU-640 (CONTROLADOR DE TEMPERATURA)	BECKMAN		NO TIENE	4321349
HOMOGENIZADOR POLITRON	BRINKMANN		PT2000	1162
IMPRESORA INYECCION TINTA 640-C	HEWLETT PACKARD		DESKJET 640-C	MX118130ZV
MICROPIPETA 10 µL	WHEATON SOCOREX	822.0010	CALIBRA 822	12441226
MICROPIPETA 100 µL	WHEATON SOCOREX VWR	822E.0100	CALIBRA 822	1141092
MICROPIPETA 1000 µL	HIGH TECH LAB		VE 1000	90026827
MICROPIPETA 20 µL	WHEATON SOCOREX	822.0020	CALIBRA 822	0152075
MICROPIPETA 200 µL	WHEATON SOCOREX	822.0200	CALIBRA 822	0251522
POLITRON (CÚCHILLA GRANDE)	BRINKMANN			
POTENCIÓMETRO (ELECTRODO)	BECKMAN	511052	FUTURA GEL- FILLED	
PURIFICADOR DE AGUA ROTOR DE CENTRIFUGA	MILLIPORE BECKMAN	361130	MILLIQ-PLUS F241.5 radio = 8 cm	F4MM75720A
VÓRTEX	THERMOLYNE	MAXI MIX II	M37615	15696

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

5.2 METODOS

5.2.1 Diagrama de Flujo



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

5.2.2 Preparación de extractos acuosos de ajo

a) Ajo en polvo control: Se pesaron 0.6 g de ajo en polvo y se le agregaron 6 ml de agua destilada, se agitó 20 minutos, se centrifugó a $20,124 \times g/5 \text{ min}$ a 4°C . Se trabajó con el sobrenadante y se realizaron las siguientes diluciones: 0.025%, 0.01%, 0.0075% y 0.005%.

b) Ajo en polvo sometido a alta temperatura: Se obtuvo el extracto acuoso a partir de dientes de ajo como se menciona en el inciso anterior. Se calentó 20 min a fuego directo (ebullición) y se restituyó con agua destilada. Se centrifugó a $20,124 \times g/5 \text{ min}$ a 4°C , se obtuvo el sobrenadante y se realizaron las siguientes diluciones: 0.01% y 0.005%.

c) Diente de ajo control: Se pesaron 20.8 g de dientes de ajo y se agregaron 40 ml de agua destilada, se picó el ajo en un mortero, se homogenizó en un politrón y se realizaron dos centrifugaciones, la primera a $1,277 \times g/10 \text{ min}$ y la segunda a $20,124 \times g/5 \text{ min}$ a 4°C . Se obtuvo el sobrenadante y se hicieron las siguientes diluciones: 0.37%, 0.2%, 0.125% y 0.06%

d) Diente de ajo sometido a alta temperatura: Se obtuvo el extracto acuoso a partir de dientes de ajo como se menciona en el inciso anterior. Se calentó 20 minutos a fuego directo (ebullición) y se restituyó con agua destilada, se efectuó una centrifugación a $20,124 \times g/5 \text{ min}$ a 4°C y del sobrenadante se hicieron las siguientes diluciones: 0.2% y 0.1%

5.2.3 Obtención del suero

Se obtuvieron 7 ml de sangre de sujetos humanos con ayuno de 12 horas. El suero se separó utilizando procedimientos estándar y se almacenó a -80°C hasta su análisis.³²⁻³⁴

5.2.4 Oxidación de las lipoproteínas del suero

La susceptibilidad a la oxidación *in vitro* de las LDL del suero se determinó por el método escrito por Regnstrom et al.³⁰ con pequeñas modificaciones.³⁴ El suero se diluyó 0.67% en amortiguador de fosfatos 0.02 mM, pH 7.4 (PBS), 0.16 M NaCl saturado con oxígeno. La oxidación del suero se inició mediante la adición de una solución recién preparada de CuSO_4 a una concentración final de $12.5 \mu\text{M}$ a 37°C .

La tabla 4 detalla el volumen utilizado de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción.

Tabla 4. Volumen de cada uno de los componentes de la mezcla

Componente	Control	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
PBS	943 μl					
Suero	6.7 μl					
CuSO_4 1 mM	12.5 μl					
H_2O destilada	37.5 μl	17.5 μl				
Extracto acuoso de Ajo	-----	20 μl				
SUMA	1000 μl					

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al establecer la técnica para estudiar la oxidación de las LDL en el suero completo se obtuvieron las siguientes condiciones óptimas para su operación (ver tabla 5).

Tabla 5. Condiciones óptimas para estudiar la oxidación de las LDL

PBS	20 mM, pH 7.4
Suero	0.67% en PBS (Buffer de Fosfatos)
CuSO ₄	12.5 μM (Concentración Final)
O ₂	Disuelto a saturación (5 min)

La cinética de oxidación se monitoreó mediante lecturas espectrofotométricas a 234 nm, para seguir la formación de dienos conjugados.³²⁻³⁵

Se registraron lecturas de densidad óptica (DO) cada 10 minutos, durante 240 min usando el software Kinetics / time del espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640. Con estos datos se construyó la curva de la cinética de la oxidación (los datos se ajustaron a cero) y a partir de ella se calculó la fase de latencia (FL). La FL definida como el intervalo entre la adición del CuSO₄ y el inicio de oxidación rápida, se determina por la intersección de la recta de la línea basal con la tangente de la fase de la oxidación.³²⁻³⁵

La duración de la fase de latencia es una medida directa de la resistencia de las LDL a la oxidación y, principalmente, está relacionada con el contenido de antioxidantes. Se calculó también las pendientes de las diferentes curvas de oxidación obtenidas y el área bajo la curva.

5.2.5 Análisis estadístico

Las variables para describir diferencias entre las curvas de oxidación, fueron:

- a. La fase de latencia (FL).
- b. Las pendientes de la fase de propagación.
- c. El área bajo la curva de oxidación.

Se calculó el promedio \pm el error estándar (EE) de cada una de estas variables. La FL y la pendiente se calcularon obteniendo la regresión sigmoideal de la curva de oxidación usando el software Origin Graph 6.0. El promedio, el EE y el área bajo la curva se obtuvieron usando el software Graph Pad Prism 3.02

La diferencia global entre los grupos estudiados se evaluó con el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar si existen diferencias significativas entre ellos. Con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni se determinó entre cuales grupos existía diferencia significativa. Se estableció el nivel de significancia estadística de 0.05.³⁴

6) RESULTADOS

6.1 DATOS DE LOS SUJETOS HUMANOS A PARTIR DE LOS CUALES SE OBTUVO EL SUERO.

En la tabla 6 se presentan los datos de los sujetos humanos a partir de los cuales se obtuvo la sangre para la obtención del suero.

Tabla 6. Datos de los sujetos humanos

n=5	INICIALES	SEXO	EDAD	ESTATURA	PESO CORPORAL
1	JPCH	M	46 años	1.78 m	70 Kg.
2	ICHL	F	24 años	1.70 m	55 Kg.
3	LCC	F	24 años	1.68 m	65 Kg.
4	VMMA	M	26 años	1.75 m	66 Kg.
5	MGAM	F	26 años	1.63 m	53 Kg.

6.2 EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE AJO EN POLVO SOBRE LA OXIDACIÓN DE LAS LDL

En la tabla 7 se muestran los resultados de las diferentes concentraciones de polvo de ajo, utilizando en análisis de varianza paramétrico y la prueba de Bonferroni (comparación múltiple entre grupos). El área bajo la curva disminuye cuando aumenta la concentración de los extractos acuosos de polvo de ajo. La fase de latencia por su parte, es mayor cuando aumenta la concentración de los extractos acuosos de polvo de ajo. La pendiente de la fase de propagación sólo disminuye a la concentración mas alta (0.01%). En la figura 4 se muestran las gráficas de la oxidación de LDL del suero de los 5 sujetos estudiados.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 7. Efecto del extracto acuoso de polvo de ajo sin calentamiento sobre la oxidación de las LDL.

Concentración del extracto acuoso de ajo en polvo	⊖Área bajo la curva (Media ± EE)	⊖Fase de latencia (Media ± EE)	Pendiente de la fase de propagación (Media ± EE)
Control	32.9 ± 2.1	23.8 ± 4.1 *	0.02 ± 0.001
0.005%	27.4 ± 2.2 ^b	70.37 ± 2.3 *	0.019 ± 0.001
0.00075%	17.5 ± 1.4 ^{a,b,c}	106.1 ± 2.6 *	0.018 ± 0.002
0.01%	11.6 ± 1.5 ^{a,c}	128.5 ± 3.0 *	0.014 ± 0.002 ^d
0.025%	6.0 ± 0.8 ^a	n.d	n.d

n=5

Área bajo la curva

Fase de latencia

Pendiente

a p < 0.001 vs control

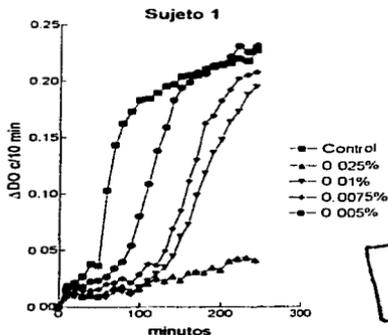
todas * p < 0.001

d p < 0.05 vs control

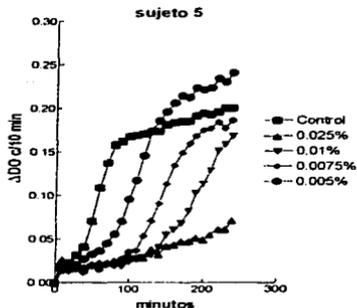
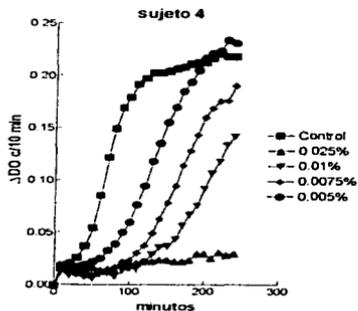
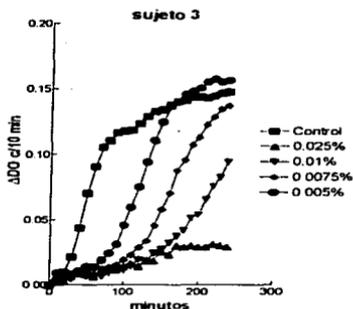
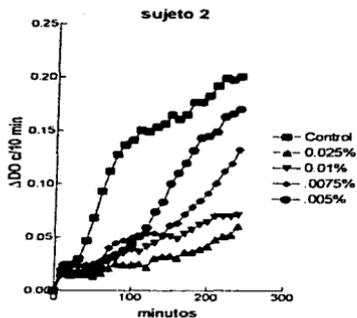
b p < 0.01 vs 0.025 %

c p < 0.01 vs 0.005%

Fig. 4 Efecto del extracto acuoso de polvo de ajo sin calentamiento sobre la oxidación de las LDL.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la tabla 8 se muestran los resultados de las diferentes concentraciones de polvo de ajo, utilizando el análisis de varianza paramétrico y la prueba de Bonferroni (comparación múltiple entre grupos). El área bajo la curva disminuye cuando aumenta la concentración de los extractos acuosos de polvo de ajo. La fase de latencia por su parte, es mayor cuando aumenta la concentración de los extractos acuosos de polvo de ajo. La pendiente de la fase de propagación sólo disminuye a la concentración mas alta (0.1%).

Se observa que el calentamiento no afecta el área bajo la curva, la fase de latencia y la pendiente de la fase de propagación a la misma concentración.

En la figura 5 se muestran las gráficas de la oxidación de LDL del suero de los 5 sujetos estudiados.

Tabla 8. Efecto del extracto acuoso de polvo de ajo con y sin calentamiento sobre la oxidación de las LDL.

Concentración del extracto acuoso de ajo en polvo	⊕Área bajo la curva (Media ± EE)	⊕Fase de latencia (Media ± EE)	Pendiente de la fase de propagación (Media ± EE)
Control	30.6 ± 1.8 ^a	29.4 ± 3.7 ^a	0.025 ± 0.001
0.005%	19.4 ± 2.0 ^b	88.4 ± 6.3 ^b	0.020 ± 0.002
0.005% Δ	22.6 ± 1.9 ^b	70.7 ± 6.2 ^b	0.020 ± 0.002
0.01%	8.7 ± 0.6 ^c	158.7 ± 5.0 ^c	0.016 ± 0.002 *
0.01% Δ	11.7 ± 1.6 ^c	134.6 ± 6.7 ^c	0.016 ± 0.002 *

n=5

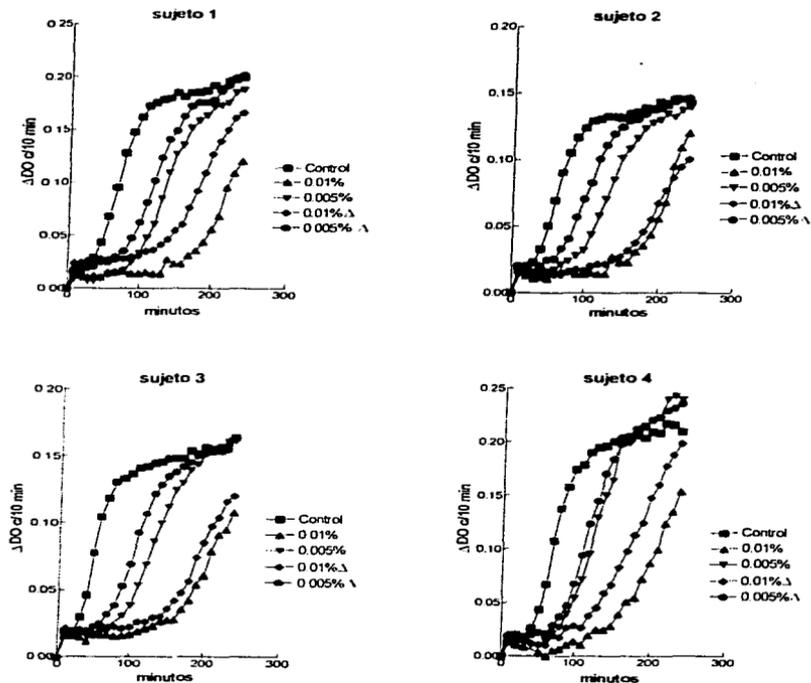
Δ (calentado 20 min)

⊕ Letras diferentes indican p < 0.05

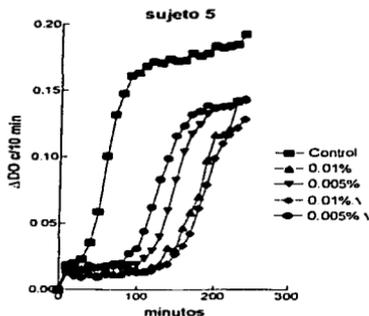
p < 0.05 vs control

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Fig.5 Efecto del extracto acoso de polvo de ajo con y sin calentamiento sobre la oxidación de las LDL.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.3 EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE DIENTE DE AJO SOBRE LA OXIDACIÓN DE LAS LDL

En la tabla 9 se muestran los resultados de las diferentes concentraciones del extracto acuoso de diente de ajo, utilizando un análisis de varianza paramétrico y la prueba de Bonferroni (comparación múltiple entre grupos). El comportamiento que sigue el extracto acuoso de diente de ajo es similar al extracto acuoso de polvo de ajo. El área bajo la curva disminuye cuando aumenta la concentración de los extractos acuosos de diente de ajo. La fase de latencia por su parte, es mayor cuando aumenta la concentración de los extractos acuosos de diente de ajo. La pendiente de la fase de propagación sólo disminuye a la concentración mas alta (0.2%).

En la figura 6 se muestran las gráficas de la oxidación de LDL del suero de los 5 sujetos estudiados.

Tabla 9. Efecto del extracto acuoso de diente de ajo sin calentamiento sobre la oxidación de las LDL.

Concentración del extracto acuoso de diente de ajo	⊖Área bajo la curva (Media ± EE)	⊖Fase de latencia (Media ± EE)	Pendiente de la fase de propagación (Media ± EE)
Control	30.6 ± 2.1	38.7 ± 7.5	0.027 ± 0.002
0.05%	24.1 ± 1.7 ^{b,c}	61.3 ± 7.0 ^e	0.023 ± 0.001
0.1%	23.1 ± 0.3 ^{a,b,c}	80.3 ± 5.0 ^{d,e}	0.020 ± 0.001
0.2%	15.6 ± 1.9 ^{a,c}	119.6 ± 9.5 ^d	0.021 ± 0.002
0.3%	6.9 ± 1.7 ^{a,b}	n.d	0.017 ± 0.001 ^f

n=5

Área bajo la curva

Fase de latencia

Pendiente

a p < 0.001 vs control

d p < 0.01 vs control

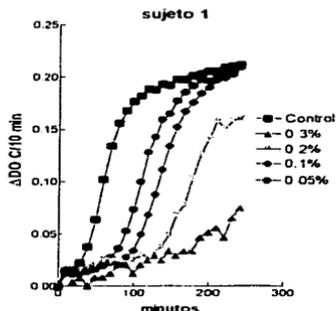
f vs control p < 0.01

b p < 0.05 vs 0.2%

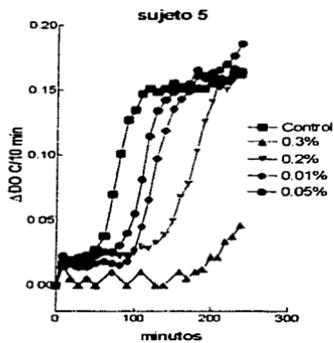
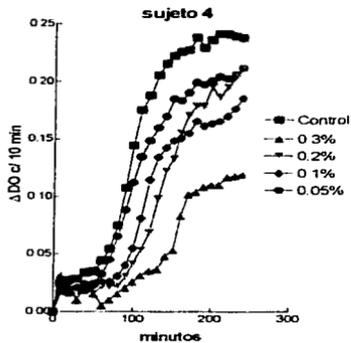
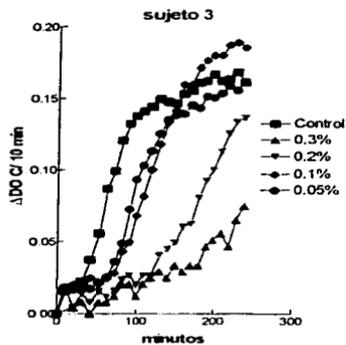
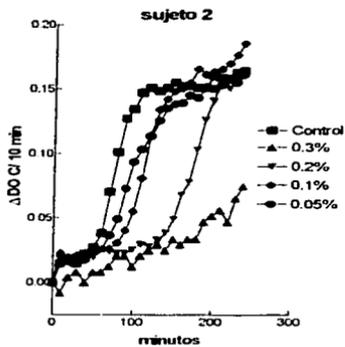
e p < 0.05 vs 0.2%

c p < 0.001 vs 0.3%

Fig.6 Efecto del extracto acuoso de polvo de ajo con y sin calentamiento sobre la oxidación de las LDL.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la tabla 10 se muestran los resultados de las diferentes concentraciones del extracto acuoso de diente de ajo, utilizando un análisis de varianza paramétrico y la prueba de Bonferroni (comparación múltiple entre grupos). El comportamiento que sigue el extracto acuoso de diente de ajo es similar al extracto acuoso de polvo de ajo. El área bajo la curva disminuye cuando aumenta la concentración de los extractos acuosos de diente de ajo. La fase de latencia por su parte, es mayor cuando aumenta la concentración de los extractos acuosos de diente de ajo. La pendiente de la fase de propagación sólo disminuye a la concentración mas alta (0.2%Δ).

Se observa que el calentamiento no afecta el área bajo la curva, la fase de latencia y la pendiente de la fase de propagación a la misma concentración.

En la figura 7 se muestran las gráficas de la oxidación de LDL del suero de los 5 sujetos estudiados.

Tabla 10. Efecto del extracto acuoso de diente de ajo con y sin calentamiento sobre la oxidación de las LDL.

Concentración del extracto acuoso de diente de ajo	⊕Área bajo la curva (Media ± EE)	⊕Fase de latencia (Media ± EE)	Pendiente de la fase de propagación (Media ± EE)
Control	28.1 ± 2.7	31.5 ± 3.2	0.027 ± 0.002
0.1%	25.0 ± 2.0	71.3 ± 6.5 ^c	0.023 ± 0.001
0.1% Δ	20.3 ± 1.6	70.8 ± 6 ^c	0.020 ± 0.001
0.2%	15.0 ± 1.3 ^{a,b}	117.4 ± 11.1 ^{c,d}	0.021 ± 0.002
0.2% Δ	12.6 ± 0.9 ^{a,b}	96.2 ± 1.4 ^c	0.017 ± 0.001 ^e

n=5 Δ (calentado 20 min)

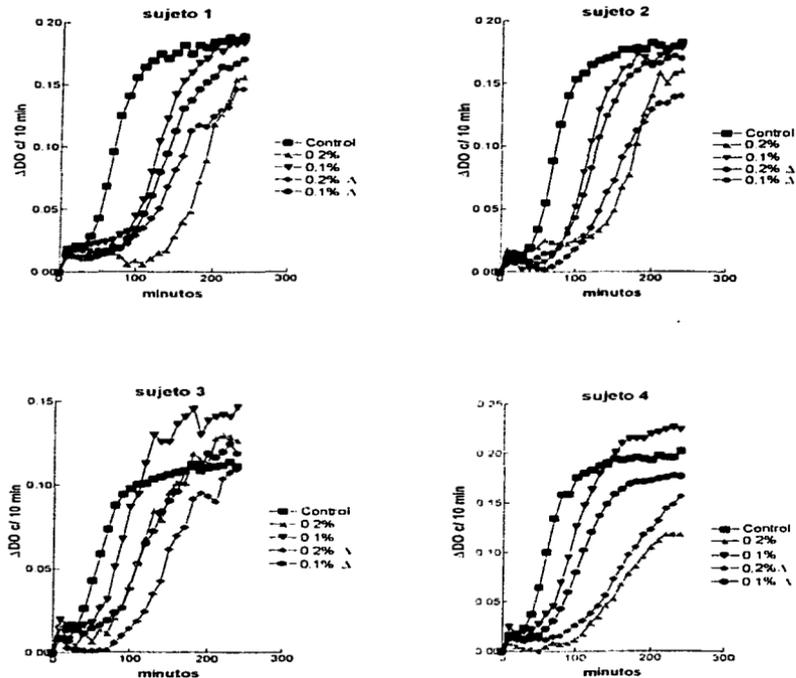
Área bajo la curva
a vs control p < 0.05
b vs 0.1% p < 0.01

Fase de latencia
c vs control p < 0.05
d vs 0.1% y 0.1%Δ p < 0.05

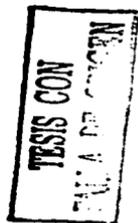
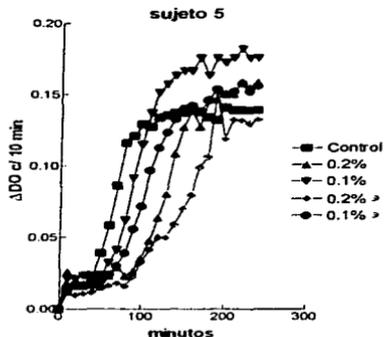
Pendiente
e vs control p < 0.05

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Fig. 7 Efecto del extracto acuoso de diente de ajo con y sin calentamiento sobre la oxidación de las LDL.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



7) DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Al establecer la técnica para estudiar la oxidación de las LDL en el suero completo se obtuvieron las siguientes condiciones óptimas (PBS 20 mM - pH 7.4, CuSO_4 12.5 μM , suero diluido al 0.67% en PBS, O_2 disuelto a saturación).

Se hicieron distintas variaciones para poder encontrar las condiciones óptimas, éstas consistieron en variar las concentraciones de CuSO_4 (12.5 μM , 25 μM y 50 μM) para encontrar el mejor comportamiento, teniendo así que con 12.5 μM la cinética de la reacción se mostraba mas reproducible.

Un punto importante a considerar es la cantidad de centrifugaciones que se le tuvieron que hacer al extracto acuoso de diente de ajo (cuatro), ya que es de extrema

importancia que se encuentre perfectamente transparente para que pueda ser leído en el espectrofotómetro UV y no sea causa de alguna alteración en la cinética de oxidación. Así mismo el suero debe estar centrifugado por lo menos tres veces para que no cause interferencia en la lectura.

En el presente estudio se evaluó el efecto de los extractos acuosos de polvo de ajo y de diente de ajo (con y sin calentamiento) sobre la oxidación de LDL en el suero. Las variables que se utilizaron describen los efectos de cada concentración: área bajo la curva, fase de latencia y la pendiente de la fase de propagación de la curva de oxidación.

Con respecto al extracto acuoso de polvo de ajo sin calentamiento se observa que las cuatro concentraciones utilizadas (0.005%, 0.0075%, 0.01% y 0.025%) tuvieron efecto inhibitorio sobre la oxidación de las LDL en el suero. Así mismo se demuestra que la capacidad antioxidante es directamente proporcional a la concentración de estos extractos acuosos, es decir, mientras más concentrado sea el extracto, mayor efecto inhibitorio tendrá sobre la oxidación de las LDL.

Al aumentar la concentración del extracto acuoso el área bajo la curva decrece, lo que indica una inhibición de las LDL a ser oxidadas, ya que es menor la cantidad de dienos conjugados formados por la oxidación de los ácidos grasos de las LDL por Cu^{2+} . Las pendientes de la fase de oxidación van disminuyendo, aunque sólo la concentración 0.01% fue significativamente distinta con respecto al control.

La fase de latencia aumenta si se encuentra más concentrado el extracto acuoso, es decir, existe una mayor resistencia de las LDL a la oxidación por Cu^{2+} mostrando una diferencia significativa entre todas las concentraciones.

Con respecto al extracto acuoso de polvo de ajo sometido a calentamiento, se observa que las cuatro concentraciones que fueron evaluadas (0.005%, 0.005% Δ , 0.01% y 0.01% Δ), tuvieron un efecto inhibitor sobre la oxidación de las LDL del suero, mostrando un efecto antioxidante.

La concentración del extracto acuoso de polvo de ajo es directamente proporcional a su actividad antioxidante, ya que como muestran los resultados la concentración de 0.01% y 0.01% Δ , tuvieron un área bajo la curva menor que 0.005%, 0.005% Δ y que el control (el cual no tiene extracto de ajo). También se observa una fase de latencia mas grande, esto es que el tiempo en que se tardó en oxidar el suero fue de 158.1 minutos para 0.001% y 134.6 minutos para 0.001% Δ . Esto sugiere que hay una mayor resistencia de las LDL del suero a ser oxidadas. Las pendientes que se obtuvieron fueron menores a esta concentración, lo que confirma que mientras más concentrado sea el extracto de ajo, tendrá mayor efecto inhibitor.

Estos resultados nos muestran que el tratamiento térmico (20 min) no afecta la actividad antioxidante ya que, como se mencionó anteriormente, no existe diferencia significativa entre las mismas concentraciones con tratamiento y sin tratamiento. Este punto es importante ya que el ajo es frecuentemente usado para cocinar. Han

investigado al respecto y se dice que no hay evidencia de que si al cocinar el ajo se destruye su actividad. Recientemente se realizó una investigación donde el ajo fue sometido a calentamiento y se le midió su capacidad atrapadora del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) resultando que el calor reduce levemente su actividad.¹⁰

Utilizando este modelo experimental, se observó que continúa presente la capacidad antioxidante del extracto de ajo calentado, solamente decrece y por eso no es significativo su descenso comparado con su misma concentración sin calentamiento.

En lo que se refiere al extracto acuoso de diente de ajo sin calentamiento, se muestra que tiene un comportamiento muy similar al extracto acuoso de polvo de ajo. Los resultados obtenidos fueron menos uniformes ya que el polvo de ajo que se utilizó fue homogéneo (del mismo envase) y en cambio, el diente de ajo que se utilizó en cada ensayo era diferente, por lo que es muy probable que la composición química de los mismos fue distinta. Esto pudo haber significado alguna variabilidad en los resultados.

Mas aún, los resultados obtenidos sugieren que las cuatro concentraciones utilizadas (0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%) tuvieron un efecto inhibitor sobre la oxidación de las LDL en el suero. Aunado a esto, se vuelve a observar que la concentración del extracto acuoso de diente de ajo fue directamente proporcional a su capacidad antioxidante. Así mismo tanto el área bajo la curva como las pendientes de la fase de oxidación decrecen cuando aumenta la concentración, lo que demostró una menor formación de dienos conjugados formados por la oxidación de los ácidos grasos de las LDL por Cu^{2+} .

Por otra parte, la fase de latencia fue mayor cuando aumentó la concentración del extracto acuoso, lo que sugiere nuevamente un efecto protector ante la oxidación de las LDL.

Con respecto al extracto acuoso de diente de ajo sometido a calentamiento, los resultados obtenidos muestran el mismo comportamiento que el extracto acuoso de polvo de ajo, es decir, las cuatro concentraciones utilizadas (0.1%, 0.1%Δ, 0.2% y 0.2%Δ) mostraron un efecto antioxidante sobre la oxidación de las LDL en el suero.

La concentración del extracto de diente de ajo es proporcional a su capacidad antioxidante, por tanto, la concentración de 0.2% fue la que tuvo un mayor efecto antioxidante. Esto es respaldado por el hecho que la fase de oxidación fue de 117.4 minutos, casi cuatro veces más que el control el cual fue de 31.5 minutos (el cual no tiene ajo).

Con respecto al área bajo la curva, los resultados muestran que al calentar el extracto de diente de ajo, el área bajo la curva es menor, lo que nos dice que tiene una mayor capacidad antioxidante que su misma concentración sin calentar. La diferencia no es significativa entre ambas concentraciones ($p > 0.05$). Con base en las pendientes de la fase de propagación, sucede el mismo fenómeno, las pendientes disminuyen cuando es calentado el extracto de diente de ajo pero el descenso no es significativo tampoco.

Es interesante comparar las fases de latencia ya que al calentar el extracto de diente de ajo, la fase de latencia decrece comparado con sus mismas concentraciones sin calentar. Esta disminución tampoco es significativa.

Estos resultados sugieren que al calentar el extracto de diente de ajo, permanece su capacidad antioxidante ya que no difiere significativamente del comportamiento del extracto acuoso de diente de ajo sin calentar.

8) CONCLUSIONES

Se estableció la técnica para estudiar la oxidación de las LDL en el suero completo y se obtuvieron las siguientes condiciones óptimas (PBS 20 mM - pH 7.4, CuSO_4 12.5 μM , suero diluido al 0.67% en PBS, O_2 disuelto a saturación). Lo que sugiere que estas condiciones describen con certeza el comportamiento de la cinética de oxidación de las LDL del suero humano.

Así mismo, se demuestra que los diferentes extractos acuosos de ajo (polvo de ajo y diente de ajo) inhiben *in vitro* la oxidación de las LDL en el suero.

Aunque es un estudio *in vitro*, los resultados obtenidos sugieren que las propiedades antioxidantes del ajo pueden ser valoradas para prevenir el desarrollo y progresión de la aterosclerosis. Se concluye que al ser sometidos los diferentes extractos acuosos de ajo (polvo de ajo y diente de ajo) a calentamiento a ebullición por 20 minutos, continúa su capacidad antioxidante por lo que se pueden recomendar para su consumo, como ingredientes benéficos aparte de aportar un buen sabor a los alimentos.

9) PERSPECTIVAS

1. Medición de la capacidad antioxidante de ajo en escabeche y ajo hervido antes de cortar sobre la oxidación de las LDL con Cu^{2+} en el suero humano.
2. Evaluar el efecto de la alicina y la S-alil cisteína sobre la oxidación de las LDL con Cu^{2+} en el suero humano.
3. Dilucidar el mecanismo por el cual el extracto acuoso de ajo inhibe la oxidación de las LDL con Cu^{2+} por medio del sistema xantina-xantina oxidasa.
4. Estudiar si la oxidación de las LDL se ve inhibida después del consumo de ajo en humanos.

10) BIBLIOGRAFIA

1. Lau BH. Suppression of LDL oxidation by garlic. *J Nutr* 2001;131(3s):985S-8S.
2. Enfermedades del corazón, primera causa de muerte en México. Comunicado de prensa No. 006 10/Enero/2002. Secretaría de Salud. México, D.F.
3. Munday JS, James KA, Fray LM, Kirkwood SW, Thompson KG. Daily supplementation with aged garlic extract, but not raw garlic, protects low density lipoprotein against in vitro oxidation. *Atherosclerosis* 1999;143:399-404.
4. García AJ. La composición química del ajo y sus propiedades antioxidantes. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. UNAM, México D.F. 2003.
- 4^a Reuter DR, Koch HP, Lawson LD. Therapeutic Effects and Applications of garlic and its preparations. En: Koch HP, Lawson LD, eds. *Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species*; Williams & Wilkins; Baltimore, 1996:135-211.
5. Lawson LD. Garlic. A review of its medicinal effects and indicated active compounds. Lawson LD & Bauer R, eds. *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity*. American Chemical Society Symposium series 691, Washington, DC 1998. pp 176-209.
6. Ide N, Lau BH. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kappa b activation. *J Nutr* 2001;131:1020S-6S
7. Ho SE, Ide N, Lau BH. S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine* 2001;8:39-46.
8. Weiss RF. *Herbal Medicine*; Beaconsfield Publishers; Beaconsfield, England, 1998; pp 170-175.
9. Block E. The chemistry of garlic and onions. *Scientific America* 1985;252:114-9.
10. Prasad k, Laxdal VA, Yu M, Raney BL. Evaluation of hydroxyl radical scavenging property of garlic. *Mol Cell Biochem* 1996;154:55-63.
11. Stupans I, Kirlich A, Tuck KL, Hayball PJ. Comparison of radical scavenging effect, inhibition of microsomal oxygen free radical generation, and serum lipoprotein oxidation of several natural antioxidants. *J Agric Food Chem* 2002;50:2464-2469.
12. Dillon SA, Burmi RS, Lowe GM, Billington D, Rahman K. Antioxidant properties of aged garlic extract: an in vitro study incorporating human low density lipoprotein. *Life Sci* 2003;72:1583-1594.

13. Mennella JA, Johnson A, Beauchamp GK. Garlic ingestion by pregnant women alters the odor of amniotic fluid. *Chem Senses* 1995;20:207-209.
14. Lachmann G, Lorenz D, Radeck W, Steiper M. The pharmacokinetics of the S35 labeled garlic constituents alliin, alliin and vinyldithiine. *Arzneimittelforschung* 1994;44:734-743.
15. Lawson LD, Wang ZJ. Pre-hepatic fate of the organosulfur compounds derived from garlic (*Allium sativum*). *Planta Med* 1993;59:A688.
16. 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;43:1751-1753.
17. 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;44:3778-3782.
18. Lawson LD. En: Human medicinal agents from plants; Kinghorn AD, Balandrin MF. Eds, American Chemical Society Symposium series 534, Washington, DC 1993. pp 306-330.
19. 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;55:257-261.
20. 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;4:642-647.
21. Egen-Schwind C, Eckard R, Kemper FH. Metabolism of garlic constituents in the isolated perfused rat liver. *Planta Med* 1992;58:301-305.
22. Liu L, Yeh YY. Inhibition of cholesterol biosynthesis by organosulfur compounds derived from garlic. *Lipids* 2000;35:197-203
23. Nagae S, Ushijima M, Hatono S, Imai J, Kasuga S, Matsuura H, Itakura Y, Higashi Y. Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Med*. 1994;60:214-217.
24. Koch HP, Lawson LD. Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species; Williams & Wilkins: Baltimore 1996.

25. Cavallito C.J, Buck JS, Suter CM. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. Determination of the chemical structure. *J Am Chem Soc* 1944;66:1952-1954.
26. Diaz LC. Obtención de anticuerpos contra la lipoproteína de baja densidad aislada de plasma humano y su aplicación en la técnica de radioinmunoanálisis. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. Biología, México D.F. 1992.
27. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J Clin Invest* 1983;72:743-747.
28. Brown MS, Goldstein JL. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci Am* 1984;251:58-66.
29. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Engl J Med* 1989;320:915-924.
30. Regnstrom J, Strom K, Moldeus P, Nilsson J. Analysis of lipoprotein diene formation in human serum exposed to copper. *Free Radic Res Commun* 1993;19:267-278.
31. Burkitt MJ. A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys* 2001;394:117-135
32. Gheldof N, Engeseth NJ. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of *in vitro* lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem* 2002;50:3050-3055.
33. Posadas-Sanchez R. Estudio de la función vascular en ratas nefróticas con deficiencia de antioxidantes. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 1999.
34. Hodgson JM, Croft KD, Puddey IB, Mori TA, Beilin LJ. Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit *in vitro* lipoprotein oxidation in serum. *J Nutr Biochem* 1996;7:664-669.
35. Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ. Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem* 2003;51:1500-1505.