



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DE DIFERENTES EXTRACTOS DE AJO SOBRE LA
OXIDACION DE LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD EN
SUERO HUMANO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

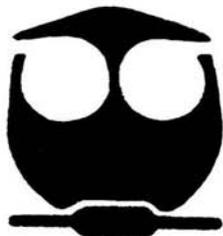
QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

MARIANA GIL ORTIZ



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**



MEXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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. Lucía Gabriela Bascuñán Termini
Vocal	Prof. Lucía Cornejo Barrera
Secretario	Prof. José Pedraza Chaverri
1er. Suplente	Prof. Francisco Javier Plasencia de la Parra
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: Mariana Gil Ortiz



Two handwritten signatures are placed over two horizontal lines. The top signature is in cursive and reads 'Pedraza'. The bottom signature is also in cursive and appears to be 'Mariana Gil Ortiz'.

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.

Gandhi, Mahatma

Hemos olvidado que nuestra única meta es vivir y que vivir lo hacemos cada día y que en todas las horas de la jornada alcanzamos nuestra verdadera meta si vivimos... Los días son frutos y nuestro papel es comerlos.

Giono, Jean

Puede decirse que la diferencia más sobresaliente entre los hombres de ciencia y los demás profesionales es que los primeros aceptan su ignorancia y parten de ella para realizar sus trabajos y observaciones, mientras que los segundos basan sus actividades en los conocimientos que ya poseen o creen poseer. -

Ruy Perez Tamayo
científico mexicano

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Les dedico de manera especial a mis padres este trabajo, ya que son parte del fondo y sostén que lo alimentaron a lo largo de su desarrollo.

A mi padre le agradezco enormemente el haberme formado y el enseñarme las diferentes formas que existen para decir *te quiero*. Así como demostrarme su infinito apoyo durante mi vida.

A mi madre le agradezco la oportunidad de conocerla mas allá, por apoyar mis ideas más locas; gozar conmigo mis victorias y llorar mis derrotas. Por ser más que una madre para mí.

A ambos les debo la enseñanza de saber que no importa cuantas veces caigas, si no como has sabido levantarte; así como que no existen imposibles.

A mi hermano Miguel, le agradezco todo cuanto ha hecho por mí; eres un gran ser humano y me siento muy orgullosa de formar parte de tu vida. Sabes que apoyo todos tus sueños...

A mi madrina Isabel, le dedico este trabajo ya que ha estado a mi lado desde que esta travesía empezó, pero sobretodo por que nunca ha dejado de creer en mí. Gracias por saber ser mi amiga y por preocuparte por mí.

A mi Tata, por ser mi personaje inolvidable. Gracias por brindarme una infancia llena de recuerdos felices. Y darme un gran ejemplo de perseverancia.

A Youssef, gracias por haber estado a mi lado, por enseñarme tantas cosas de mí que desconocía, aprender de tí que nada es imposible y por creer en mí. TA.

A Paola y a Tino por recorrer este tramo del camino desde el principio; a Mauricio, Laura, Tania y May por habernos conocido a mitad del camino. A todos, por permitirme adentrarme en su vida y por demostrarme de una manera inexplicable que la vida se encarga de juntar a la gente indicada y que la amistad existe; pase lo que pase siempre estarán conmigo. Gracias por hacer de la vida junto a ustedes un sin fin de aventuras.

A Gaby por haberme enamorado de este proyecto, así como la confianza y la amistad brindada.

En este trabajo hay trazas de cada uno de ustedes.

A mi querida hermana y amiga Fer, gracias por enseñarme que una distancia no rompe una amistad si no que la hace más fuerte; gracias por estar siempre presente.

Al Dr. José Pedraza Chaverri la oportunidad de trabajar, así como la confianza y el apoyo brindado a lo largo de mi estancia en el laboratorio. En verdad muchas Gracias.

Al laboratorio 209: Irasema, Marisol, Rosaura, Isaac y Omar. Gracias por adoptarme, por su cariño y apoyo.

A mi amada Universidad, por haberme dado tanto y enseñarme a crecer.

ÍNDICE

	Página
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 El ajo y sus propiedades	3
2.2 Compuestos presentes en el ajo	5
• Resumen de la evidencia de los compuestos activos del ajo	7
2.3 La aterosclerosis	8
2.4 Las lipoproteínas	10
• Lipoproteínas de baja densidad	10
2.5 Propiedades quelantes de los extractos de ajo	11
3. Hipótesis	13
4. Objetivos	13
5. Metodologías	15
• Materiales y reactivos	15
• Soluciones	15
5.1 Oxidación del suero: dienos conjugados	16
• Diagrama de flujo	16
• Preparación de extractos acuosos	17
• Aislamiento del suero	18
• Oxidación de las lipoproteínas del suero	18
• Análisis estadístico	20
5.2 Propiedades quelantes del ajo: xantina-xantina oxidasa	22
• Diagrama de flujo	22
• Preparación de extractos acuosos	23
• Tabla de proporciones empleadas en la técnica	23
• Análisis estadístico	24
6. Resultados y Discusión	25
6.1 Oxidación del suero: dienos conjugados	25

• Efecto del extracto de ajo hervido	26
• Efecto del extracto de ajo calentado en microondas	29
• Efecto del extracto de ajo en escabeche	32
6.2 Propiedades quelantes del ajo: xantina-xantina oxidasa	39
• Efecto del extracto de diente de ajo crudo	39
• Efecto del extracto de ajo hervido	41
• Efecto del extracto de ajo calentado en microondas	43
• Efecto del extracto de ajo en escabeche	45
7. Conclusiones	50
8. Bibliografía	51

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto de tres extractos acuosos de ajo sometidos a un tratamiento previo (ebullición, microondas y escabeche) sobre la oxidación de lipoproteínas en el suero de cinco sujetos. De esta manera se evaluó si los tratamientos mencionados afectan la capacidad antioxidante del ajo. Se empleó la técnica para estudiar la oxidación de las lipoproteínas en el suero de humanos establecida anteriormente en otro proyecto de este laboratorio.

Las condiciones de la técnica empleadas fueron las adecuadas para poder medir la cinética de oxidación de las lipoproteínas. 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 por la oxidación *in vitro* de las lipoproteínas con cobre (II). Se demostró que la capacidad antioxidante del ajo sometido a los diferentes tratamientos, no disminuyó su capacidad de inhibir la oxidación *in vitro* de las lipoproteínas, recalcando su capacidad antioxidante y así poder recomendarlo para su consumo, no solo por sus propiedades culinarias sino también por sus propiedades benéficas como antioxidante.

Así también se encontró, por medio del sistema enzimático xantina-xantina oxidasa, que los extractos de ajo estudiados son incapaces de restaurar la actividad de la enzima inhibida por Cu^{2+} de lo que se concluye que estos extractos son incapaces de quelar al Cu^{2+} y de que, por lo tanto, este no es su mecanismo de acción para proteger a las lipoproteínas de la oxidación.

1. INTRODUCCIÓN

Se realizó este proyecto con el fin de ampliar la información obtenida del estudio anterior¹; con respecto a las capacidades antioxidantes del extracto acuoso de ajo. Los procedimientos que se explorarán en este estudio son la ebullición del diente de ajo, y el calentamiento en microondas y la preparación en escabeche antes de realizar el extracto acuoso. Algunos autores han dicho que un tratamiento térmico del ajo, como la ebullición, puede modificar, o incluso anular, sus propiedades terapéuticas.² Con este estudio se podrá saber si el tratamiento térmico anterior o la preparación en escabeche alteran su capacidad antioxidante y así recomendar para su uso no sólo como condimento, sino también por sus propiedades antioxidantes.

La dieta en una población juega un papel importante en el desencadenamiento de diversas enfermedades, incluyendo las de tipo cardiovascular. El ajo ha tomado una reputación en diversas culturas acerca de sus características terapéuticas en varias enfermedades (cardiovasculares, antiinflamatorias, cáncer, neurodegenerativas, etc.) debido a algunas de sus propiedades (detoxificante, antimicrobiana, antioxidante, etc.).³ Es importante recalcar que en México se estima que alrededor de 18 millones de habitantes sufren de algún tipo de enfermedad cardiovascular.⁴

En las últimas dos décadas se ha hecho una fuerte asociación entre la elevada cantidad de lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en el suero humano, y el desarrollo de la aterosclerosis.

Se ha postulado que la oxidación de las lipoproteínas modifica su estructura y desencadena su depósito en las paredes de los vasos sanguíneos iniciando así el mecanismo de la aterosclerosis.

Se ha estudiado que la suplementación del ajo en la dieta, aumenta la resistencia de las lipoproteínas a la oxidación. Sugiriendo un potencial del ajo.⁵

Para poder evaluar la capacidad antioxidante de los diferentes extractos de ajo (de ajo hervido, calentado en microondas y preparado en escabeche antes de ser cortado) se utilizó un método experimental *in vitro* reproducible y confiable. Por este método se midió la resistencia de las lipoproteínas a la oxidación con los diferentes extractos.

Para completar los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se decidió tratar de dilucidar el mecanismo de acción por el cual los extractos acuosos de ajo protegen a las lipoproteínas de la oxidación inducida por Cu^{2+} , determinando si los extractos de ajo tienen la capacidad de quelar Cu^{2+} .

Lo anterior se realizó estudiando si los extractos de ajo son capaces de revertir la inhibición de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} .

2. ANTECEDENTES

2.1 EL AJO Y SUS PROPIEDADES

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. El ajo ocupa un lugar importantísimo en la historia culinaria así como de la medicina popular.⁶

El ajo es una de las plantas que ha atraído mucha atención en los últimos diez años; ya sea en forma natural o en preparaciones comerciales para su uso como complementos para la salud; debido a su contenido de antioxidantes naturales los cuales pueden proteger al organismo en contra de algunos tipos de cáncer y la aterosclerosis.⁷

Fuertes evidencias muestran que muchas de las propiedades benéficas, se atribuyen a compuestos específicos presentes en el ajo. Los análisis químicos relacionados han identificado a los compuestos organosulfurados⁸ como los responsables de su bioactividad. La concentración de dichos compuestos puede variar con respecto a las condiciones de preparación o proceso.

Uno de los compuestos al que se atribuye una mayor capacidad antioxidante es la alicina; la cual es formada a partir de la alina por la enzima alinasa. Esta enzima es una glucoproteína que se pone en contacto con su sustrato (alina) cuando el ajo se machaca o se pica, y como otras enzimas es termolábil.² Algunas de las condiciones en las cuales ésta enzima es inhibida son⁶:

- Calentamiento a temperatura de ebullición por 15 min.

- Calentamiento en horno de microondas (650 W) por 15-30 seg.
- Valores de pH menores a 4.5

Se ha visto que el tratamiento de los extractos acuosos de ajo a 100°C por 20, 40 o 60 minutos puede reducir su actividad antioxidante, en un porcentaje del 10%.² Sin embargo algunos autores muestran que la alina posee propiedades antioxidantes al igual que la alicina, incluso se le atribuye la capacidad de inhibir la biosíntesis del colesterol.⁹ Otras de las propiedades de la alina descritas en la literatura son: inhibición de la oxidación de lipoproteínas por Cu²⁺ (a una concentración de 1 y 10 mM)¹⁰ y una baja capacidad de atrapar radicales hidroxilo en comparación con los componentes del extracto de ajo envejecido (a 10 mM el 50%)¹¹.

Es importante en este estudio revisar el efecto que tiene el tratamiento térmico sobre las propiedades del ajo. En donde vemos que este puede ser adverso en el caso de sus propiedades antitrombóticas (no cambio significativamente el nivel de tromboxanos en comparación al control)¹², síntesis de prostanoides (no hubo diferencia significativa)¹³, anticancerígeno (bloqueo total en 60 segundos en microondas antes de machacarlo)², entre otras. Pero así como el tratamiento térmico afecta estas propiedades, se ha encontrado que este tratamiento no afecta o si lo afecta es de manera mínima en el caso de: atrapamiento de radicales libres, principalmente hidroxilo (reducción sólo del 10%)¹⁴, disminución de crecimiento tumoral (sin cambio)¹⁵ e incluso aumenta su capacidad antimicrobiana (teniendo el valor máximo de 15%)¹⁶. Debido ha esto, es de gran relevancia establecer si el tratamiento al cual va a someterse el ajo, puede

disminuir su capacidad para disminuir la oxidación de las lipoproteínas en suero inducida por Cu^{2+} , que es la propiedad de interés.

2.2 COMPUESTOS PRESENTES EN EL AJO

Como se mencionó anteriormente, la presencia de compuestos organosulfurados en el ajo a concentraciones altas, son los causantes de las múltiples propiedades benéficas del ajo. Por lo que la mayoría de las investigaciones analíticas y farmacológicas están enfocadas a ellos. Esto se debe, no sólo por su abundancia en el ajo, sino también a que son los que producen los efectos que se le atribuyen a esta planta en los niveles típicos en que se consume.

En la tabla 1 se presenta una lista de los compuestos organosulfurados que se encuentran en mayor cantidad en el ajo.

Tabla 1. Principales compuestos organosulfurados en el ajo entero y molido.^{17,18}

COMPUESTO	AJO ENTERO mg/g PESO FRESCO	AJO MOLIDO mg/g PESO FRESCO
S-Alquil-L-cisteína sulfóxidos		
Alil cisteína sulfóxido (alína)	6-14	nd
Metil cisteína sulfóxido (metina)	0.5-2	nd
trans-1-propenil cisteína sulfóxido (isoalina)	0.1-1.2	nd
Cicloalina	0.5-1.5	0.5-1.5
γ-L-glutamyl-S-alkil-L-cisteínas		
γ -L-glutamyl-S-trans-1-propenil cisteína	3-9	3-9
γ -L-glutamyl-S-alil cisteína	2-6	2-6
γ -L-glutamyl-S-metil cisteína	0.1-0.4	0.1-0.4
Alquilalcanotiosulfinatos		
Alil 2-propentiosulfinato (alícina)	nd	2.5-4.5
Alilmetiltiosulfinatos (2 isómeros)	nd	0.3-1.5
Alil trans-1-propeniltiosulfinatos (2 isómeros)	nd	0.05-1.0
Metiltrans-1-propeniltiosulfinatos (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 presenta en 2 clases de compuestos de abundancia similar: los S-alkil cisteína sulfóxido y las

γ -glutamil S-alquil cisteínas (tabla 1). El compuesto sulfurado más abundante en el ajo es la alina (sulfóxido de S-alil cisteína)^{17,18,19}, 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.

Los dientes de ajo intactos contienen altas concentraciones de γ -glutamil cisteínas, estos compuestos pueden ser oxidados para dar alicina (tiosulfinatos). 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.

La formación de los tiosulfinatos 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. Debido a la abundancia de la alina, el principal tiosulfinato formado cuando el ajo es triturado es la alicina, el cual varía en abundancia y alcanza valores de 60-90% del total de los tiosulfinatos. La mayor parte de la metina es convertida a 2 isómeros de alil metil tiosulfinatos: alil metanotiosulfinato, y metil 2-propentiosulfinato, el primero es dos veces más abundante que el último.^{20,21}

- **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 tiosulfatos 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 tiosulfatos.^{22,23} Existen fuertes evidencias que indican que los tiosulfatos son responsables de los efectos antimicrobianos e hipolipídico/hipocolesterolemiantes 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 2).

Tabla 2. Resumen de los principales compuestos esenciales de los dientes de ajo y sus efectos farmacológicos en los niveles normales de consumo

EFEECTO	BUENAS EVIDENCIAS	ALGUNAS EVIDENCIAS
Antimicrobiano	Alicina/ tiosulfatos	
Hipolipídico	Alicina/ tiosulfatos	
Hipotensivo	Desconocido (no tiosulfatos)	γ -glutamil fructanos cisteínas,
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 alina y de alicina tienen la mayor actividad reportada. Además, la SAC, la adenosina, las saponinas y la porción proteínica, 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.^{17,18}

2.3 LA ATEROSCLEROSIS

La generación de un exceso de radicales libres, puede desencadenar numerosas enfermedades, incluyendo cáncer, las cardiovasculares y las neurodegenerativas. Se ha investigado, que existe un balance, entre los efectos adversos ocasionados por éstos y la complementación del sistema oxidante endógeno con consumo de antioxidantes en la dieta⁸.

Con respecto a la aterosclerosis, actualmente se acepta que los radicales libres juegan un papel importante en la deposición del colesterol en las paredes de los vasos sanguíneos. En las arterias, los sustratos de los radicales libres son los

ácidos insaturados de las lipoproteínas. Cuando estas moléculas son oxidadas, adquieren propiedades nuevas⁵.

Sin embargo existe una pequeña evidencia del papel del Cu^{2+} en la modificación de las lipoproteínas *in vivo*, se ha observado que lesiones ateroscleróticas contienen una cantidad detectable de cobre reactivo. Este cobre catalítico y otros metales divalentes pueden contribuir en un ambiente prooxidante en donde la oxidación de las lipoproteínas se lleve a cabo⁷.

Estas moléculas de lipoproteínas oxidadas son reconocidas por los macrófagos encargadas de la limpieza de la íntima arterial, éstos a su vez se convierten después en células espumosas (Figura 1). Las lipoproteínas oxidadas penetran al interior de las células por endocitosis, depositando en su interior colesterol en forma de ésteres. Con el tiempo las lipoproteínas oxidadas se transforman en un centro de colesterol extracelular, desencadenando la muerte de células espumosas y con esto el crecimiento del núcleo de colesterol extracelular depositado²⁴.

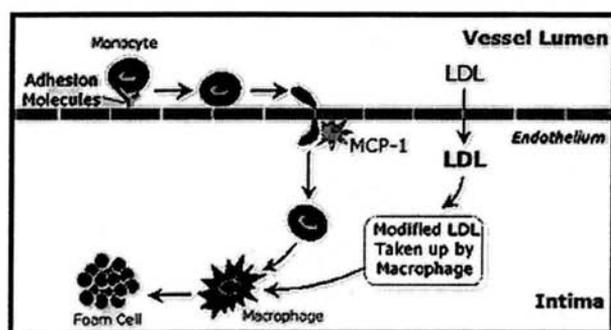


Fig 1. Proceso de formación de células espumosas a partir de LIPOPROTEÍNAS modificadas.

2.4 LAS LIPOPROTEÍNAS

La naturaleza hidrofóbica de los triglicéridos, fosfolípidos y colesterol, su demanda por la células del cuerpo, y la vía sanguínea por la que deben de llegar a ellas, hacen necesario un sistema complejo para transportarlos. Aun cuando moléculas simples, como los ácidos grasos, pueden ser transportados en el plasma en unión a la albúmina, un mecanismo eficiente para el acarreo de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol, debe ser capaz, no solo de transportar estas moléculas hidrofóbicas a través de un medio acuoso como 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) formando unidades conocidas como lipoproteínas, que satisfacen estos requerimientos.

Estas moléculas son partículas constituidas por dos zonas principales. La primera se encuentra en la parte central de la molécula en donde se encuentran los lípidos no polares como los triglicéridos y ésteres del colesterol, los cuales forman microemulsiones, siendo el agente emulsificante un fosfolípido. La segunda región es anfipática, incluye moléculas como fosfolípidos y colesterol libre.²⁵

- **LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD**

Las lipoproteínas de baja densidad tienen un diámetro de 20-22 nm. Están constituidas principalmente por ésteres del colesterol, 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 encargadas de transportar la mayor cantidad de

colesterol en el plasma humano y constituyen la principal fuente de colesterol para las células.²⁶

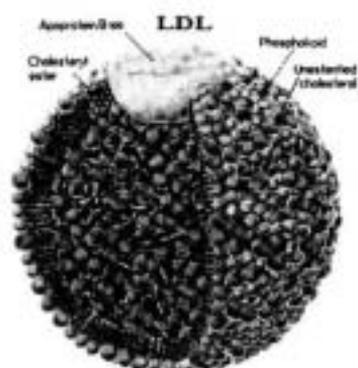


Fig 2. Estructura de una lipoproteína de baja densidad (LDL).

2.5 PROPIEDADES QUELANTES DE LOS EXTRACTOS DE AJO

Se ha encontrado en diferentes estudios que compuestos derivados del ajo como: dialilsulfuro (DAS), dialildisulfuro (DADS), S-etilcisteína (SEC) y N-acetilcisteína (NAC)²⁷; así como el extracto de ajo envejecido (AGE)⁷ poseen la capacidad de quelar al Cu^{2+} .

En este trabajo también se planea estudiar si los extractos de ajo empleados, protegen a las lipoproteínas en suero al quelar el Cu^{2+} .¹

Para determinar esta propiedad se utilizará el método descrito por Dillon et al con pequeñas modificaciones. El método se basa en que el Cu^{2+} inhibe la xantina oxidasa que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico, generándose además anión superóxido (O_2^-). La capacidad de un compuesto o extracto para reestablecer la actividad de la xantina oxidasa en

presencia de Cu^{2+} indicará que dicho compuesto/extracto es capaz de quelar Cu^{2+} . En el sistema descrito, el O_2^- reduce al nitroazul de tetrazolio (NBT), el cual es un indicador muy sensible a reacciones de óxido-reducción, y se forma un producto colorido insoluble (formazán) el cual absorbe a 560 nm^{28} la xantina oxidasa también se evaluó midiendo la producción de ácido úrico a 295 nm^{29}

Sistema generador de superóxido

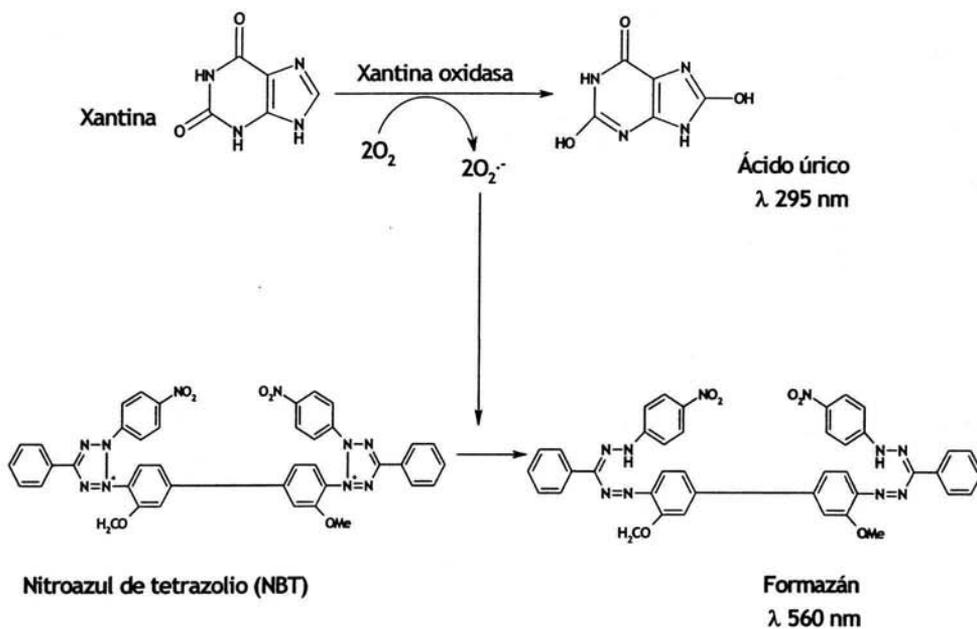


Fig 3. Mecanismo del sistema xantina-xantina oxidasa

3. OBJETIVOS

- Estudiar si la ebullición del diente de ajo por 10 min, el tratamiento del diente de ajo con microondas (1 min) y la preparación del ajo en escabeche afecta la capacidad de los extractos de ajo para inhibir la oxidación de las lipoproteínas en suero.
- Recomendar las preparaciones anteriores del ajo no solo como condimento sino como agente antioxidante en caso de que los tratamientos no reduzcan significativamente su capacidad antioxidante.
- Investigar si el atrapamiento de Cu^{2+} es el mecanismo por el cual el extracto de ajo inhibe la oxidación de las lipoproteínas en suero inducida con Cu^{2+} .

4. HIPÓTESIS

- Los diferentes tratamientos a los cuales se someterá al ajo (ebullición por 10 min, microondas por 1 min o escabeche) no afectará en forma significativa su capacidad para inhibir la oxidación de las lipoproteínas en suero humano inducida por Cu^{2+} .
- El mecanismo de acción por el cual los extractos de ajo estudiados protegen a las lipoproteínas de la oxidación inducida por Cu^{2+} se deberá a la quelación de dicho metal por estos extractos.

5. METODOLOGÍA

• MATERIALES Y REACTIVOS

Reactivo	Presentación	Catálogo	Almacenamiento	Peso molecular
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	500 g	Baker 19343	Temp. ambiente	249.686 g/mol
KH_2PO_4	500 g	Baker 3246-01	Temp. ambiente	136.09 g/mol
Na_2HPO_4	500 g	Baker 3828-05	Temp. ambiente	141.96 g/mol
H_2O destilada y desionizada			Temp. ambiente	18 g/mol
Xantina	5 g	Sigma X-0626	Temp. ambiente	152.1 g/mol
Xantina oxidasa	50 Unidades	Sigma X-4376	Refrigeración	
Na_2CO_3	500 g	Baker 3604-01	Temp. ambiente	106.99 g/mol
Nitroazul de tetrazolio (NBT)	500 mg	Sigma N-6876	Refrigeración	867.8 g/mol

• SOLUCIONES

- ✓ Amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.4 (PBS)

Reactivo	250 mL
KH_2PO_4	0.421 g
Na_2HPO_4	0.270 g

Para este cálculo se usa la ecuación de Henderson Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pka} + \log (\text{Base}/\text{Ácido})$$

- ✓ CuSO_4 1 mM

Reactivo	50 mL
CuSO_4	12.49 mg

- ✓ Xantina 0.3 mM

Reactivo	250 mL
Xantina	11.4 mg

La xantina se disuelve en 4 mL de Na_2CO_3 0.4M , y se afora a 250 mL con agua destilada; guardar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

✓ Xantina oxidasa (168 U/L)

La cantidad de xantina oxidasa depende del número de muestras y el número del lote, ya que la cantidad de unidades por mg de sólido es diferente de cada lote.

En este caso el lote tenía 0.06 U/mg, entonces para preparar 2 mL se tiene:

$$0.06 U \rightarrow 1 mg$$

$$168 U \rightarrow x = 2800 mg$$

$$mg \text{ Xantina oxidasa} = \frac{(2 mL \times 2800 mg)}{1000 mL} = 5.6 mg$$

✓ Na_2CO_3 0.4 M

Reactivo	500 mL
Na_2CO_3	21.2 g

Guardar en refrigeración.

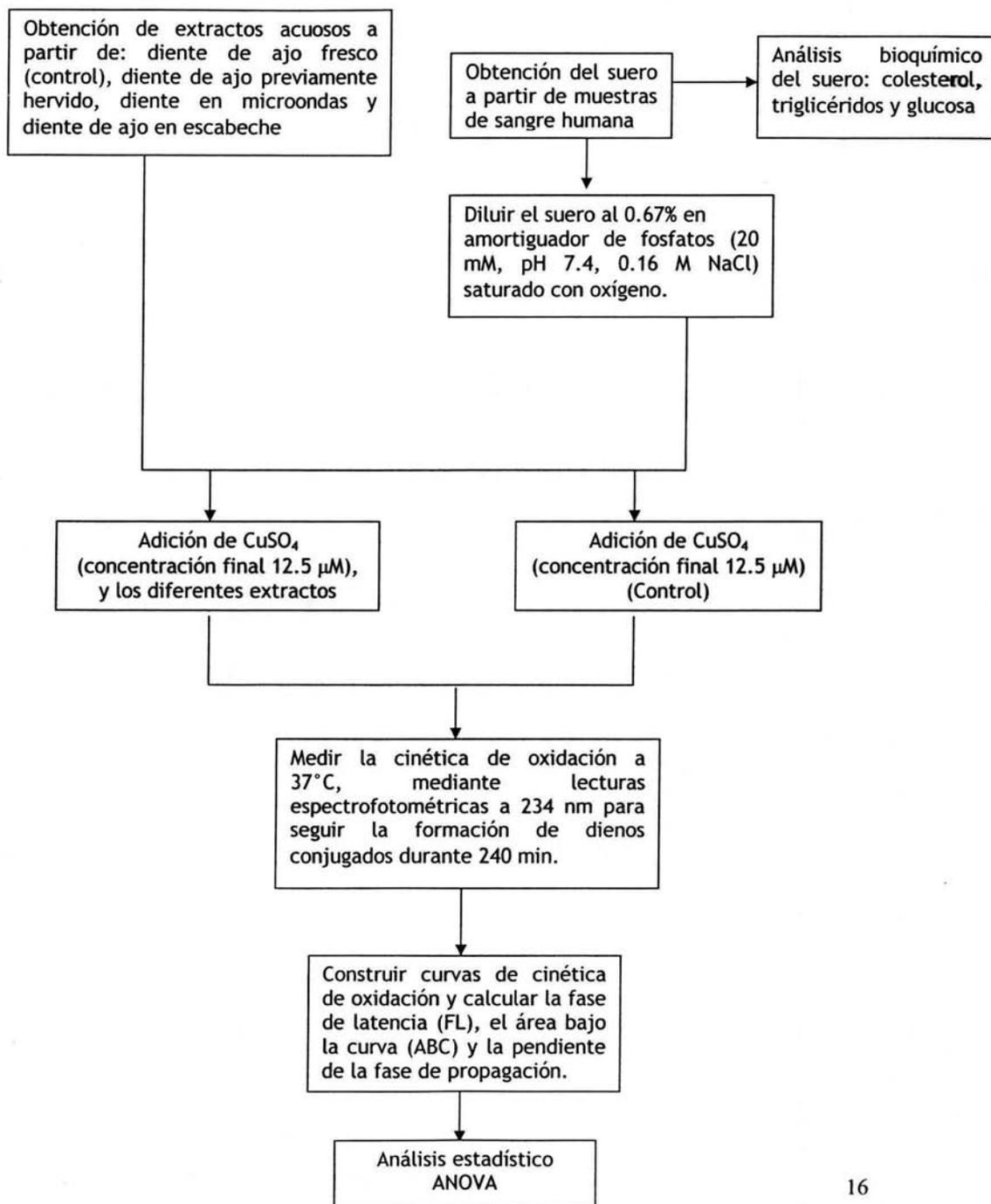
✓ Nitroazul de tetrazolio (NBT) 150 μM

Reactivo	300 mL
NBT	0.0368 g

Guardar en frasco ámbar, a 4°C.

5.1 OXIDACIÓN DEL SUERO: DIENOS CONJUGADOS

- Diagrama de flujo:



- **Preparación de extractos acuosos**

- a) Diente de ajo (control)⁶: pesar 10.4 g de dientes de ajo, cortar finamente y homogeneizar en un politrón con 40 mL agua destilada y se realizaron dos centrifugaciones, la primera a 1,277 x g/10 min y la segunda a 20,124 x g/5 min a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante y se prepararon diluciones a 0.25%, 0.5%, 1.25% y 2.5% tomando en cuenta el peso seco del ajo.
- b) Diente de ajo sin pelar sometido a tratamiento térmico previo⁶: pesar la cantidad necesaria de dientes de ajo y hervir durante 10 minutos, cortar finamente y homogeneizar en un politrón con agua destilada y se realizaron dos centrifugaciones, la primera a 1,277 x g/10 min y la segunda a 20,124 x g/5 min a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante y se prepararon diluciones a 0.25%, 0.5%, 1.25% y 2.5% tomando en cuenta el peso seco del ajo.
- c) Diente de ajo sin pelar sometido a tratamiento térmico previo⁶: pesar la cantidad necesaria de dientes de ajo y tratar con microondas por 1 minuto, cortar finamente y homogeneizar en un politrón con agua destilada y se realizaron dos centrifugaciones, la primera a 1,277 x g/10 min y la segunda a 20,124 x g/5 min a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante y se prepararon diluciones a 0.25%, 0.5%, 1.25% y 2.5% tomando en cuenta el peso seco del ajo.
- d) Diente de ajo en escabeche: los dientes de ajo pelados y hervido durante 30 minutos en una solución de ácido acético (1:1), posteriormente se envasan y se pasteuriza por 5 min a 72°C; se pesa la cantidad necesaria, se corta finamente y se homogeneiza en un politrón con agua destilada y

se realizaron dos centrifugaciones, la primera a 1,277 x g/10 min y la segunda a 20,124 x g/5 min a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante y se prepararon diluciones a 0.25%, 0.5%, 1.25% y 2.5% tomando en cuenta el peso seco del ajo.

Los dientes de ajo en escabeche se prepararon con anticipación el día 8 de octubre del 2003, y se realizaron los ensayos a partir del día 17 de noviembre del mismo año.

- **Aislamiento del suero**

Se tomaron siete mL de sangre de los cinco sujetos en estudio, los cuales fueron llevados a tubos para la obtención de suero, el cual es separado utilizando procedimientos estándar y almacenado a -80°C hasta su análisis.^{30,31}

Además se realizaron determinaciones de glucosa, colesterol y triglicéridos con ayuda de un auto-analizador, para confirmar la ausencia de alteraciones en el metabolismo de lípidos y glucosa en los sujetos estudiados.

- **Oxidación de las lipoproteínas del suero**

La susceptibilidad a la oxidación *in vitro* de las lipoproteínas del suero se determinaron por el método descrito en Rengström³² con pequeñas modificaciones¹. Cuya técnica ha sido ampliamente utilizada para estudiar la oxidación *in vitro* de las lipoproteínas del suero humano de manera conjunta sin necesidad de aislarlas^{31,33,34}, esto se debe a que al realizar los ensayos de oxidación con cada una de las diferentes lipoproteínas (HDL, LDL, VLDL e IDL) se observó que la fase de latencia era mucho menor en el caso de las LDL, lo que indica que la oxidación se debe principalmente en esa fracción³².

Las proporciones empleadas en el ensayo de oxidación del suero se muestran en la tabla 3, la cual se obtuvo en un proyecto anterior del laboratorio, donde se estableció la técnica¹.

Tabla 3. Proporciones empleadas en la técnica de dienos conjugados

	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 ₂ O destilada	37.5 μL	17.5 μL				
Extracto de ajo	-	20 μL				
Total	1000 μL					

A continuación se muestran los pasos a seguir en la técnica de oxidación del suero:

1. El suero se diluye al 0.67% en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 20 mM, pH 7.4, 0.16 M NaCl saturado con oxígeno.
2. Se adicionan los diferentes extractos de ajo, a sus diferentes concentraciones (excepto el grupo control).
3. La oxidación del suero se inicia mediante la adición de una solución recién preparada de CuSO₄ a una concentración final de 12.5 μM a 37°C.
4. La cinética de oxidación se registra mediante lecturas espectrofotométricas a 234 nm, para seguir la formación de dienos conjugados.^{30,31,33}
5. Se registraron las lecturas de densidad óptica (DO) cada 10 minutos durante 240 minutos.

Con estos datos se construyó la curva de cinética de la oxidación y a partir de ella se calculó la fase de latencia (FL); la cual se define como el intervalo entre la adición del Cu^{2+} y el inicio de la oxidación rápida, y se determina por la intersección de la recta de la línea basal con la tangente de la fase de oxidación.^{30,31,33} La duración de la fase de latencia es una medida de la resistencia de las lipoproteínas a la oxidación, y, principalmente se relaciona con el contenido de antioxidantes, en la partícula.

Se calculó también el área bajo la curva (AUC) de las diferentes curvas de oxidación obtenidas (a mayor área, mayor oxidación); y la pendiente de la fase de propagación indica la velocidad de formación de los dienos conjugados.

- **Análisis estadístico**

Las variables para describir diferencias entre las curvas de oxidación, son: a) fase de latencia, b) áreas bajo la curva de oxidación y c) pendiente.⁸

Los parámetros a analizar se obtuvieron con el software Graph Pad Prism 3.02, así como los promedios y el error estándar.

La fase de latencia se calcula por medio de la intersección de la recta de la línea basal con la tangente de la fase de oxidación y se extrapola hacia el eje de las abscisas; el área bajo la curva es dado directamente por el programa y por último la pendiente se calcula de la fase de propagación con la ayuda de una regresión lineal con el mismo programa.

La diferencia global entre los grupos estudiados se evaluó con el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar si existían diferencias significativas entre ellos.

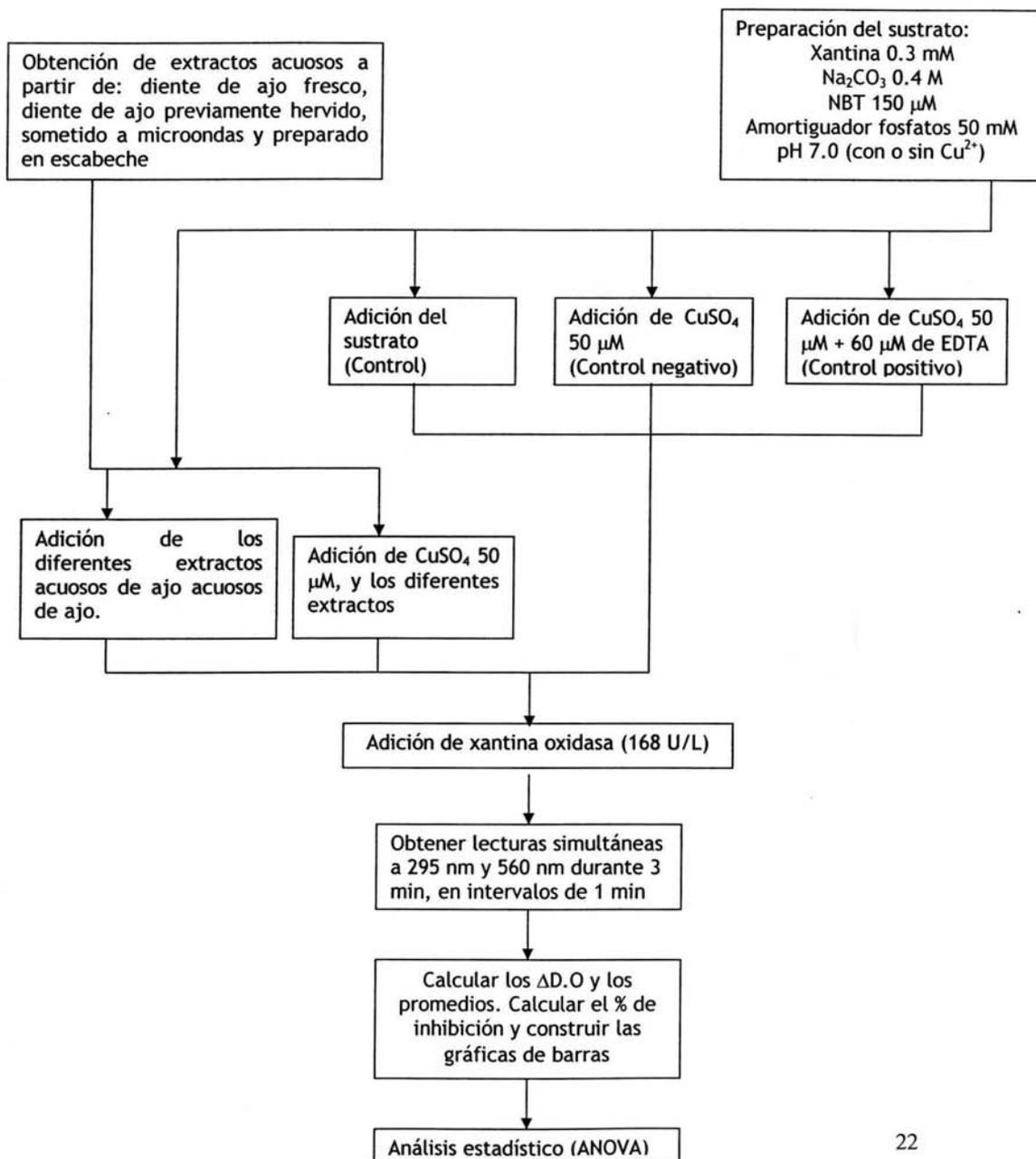
Con la prueba de Bartlett (homogeneidad de varianza) se determinó si la distribución de los datos era paramétrica o no paramétrica.

Posteriormente, con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni en el caso que los datos fueran paramétricos, en caso contrario se realizó un ANOVA (Kruskal-Wallis) con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn; para determinar entre cuales grupos existía diferencia significativa. Se estableció el nivel de significancia de 0.05.³¹

5.2 ENSAYO PARA DETERMINAR SI LOS EXTRACTOS DE AJO SON CAPACES

DE QUELAR Cu^{2+} USANDO EL SISTEMA: XANTINA-XANTINA OXIDASA

- Diagrama de flujo:



- Preparación de extractos acuosos

Se prepararon de la misma forma que en la técnica de oxidación del suero.

- Proporciones empleadas en la técnica

En la tabla 4, se muestra la manera de preparar el sustrato para el ensayo; donde la xantina es el sustrato de la enzima, el carbonato da el medio básico para la reducción del indicador el cual es el NBT.

Tabla 4. Sustrato

	Para 9 muestras	[Final]
Xantina 0.3 mM	3 mL	0.09 mM
Carbonato de sodio 0.4 M	0.4 mL	0.016 M
NBT 150 μ M	1.5 mL	22.8 μ M
Amortiguador fosfatos 50 mM, pH 7.0	2.85 mL	

Así mismo se muestra en la tabla 5, las proporciones empleadas en el ensayo, donde se tienen diferentes grupos, ya sea en presencia o ausencia de Cu^{2+} , en presencia de EDTA (compuesto quelante de Cu^{2+}) como control positivo o en presencia de los diferentes extractos de ajo. Así también se determinó la actividad de la enzima xantina oxidasa en presencia de los extractos acuosos de ajo, como punto de comparación para el grupo con Cu^{2+} .

Tabla 5. Ensayo

	Control	Cu^{2+}	EDTA/ Cu^{2+}	Cu^{2+} / Ajo	Ajo
Sustrato	750 μ L	750 μ L	750 μ L	750 μ L	750 μ L
Muestra	-	-	-	100 μ L	100 μ L
Amort. fosfatos 50 mM,	100 μ L	-	-	-	-
Amort. fosfatos 50 mM + 50 μ M Cu^{2+} + 60 μ M EDTA	-	-	100 μ L	-	-
Amort. fosfatos 50 mM + 50 μ M Cu^{2+}	-	100 μ L	-	-	-
Xantina oxidasa (168 U/L)	150 μ L	150 μ L	150 μ L	150 μ L	150 μ L
Total	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L

- **Análisis estadístico**

Se calcularon los $\Delta D.O/\text{min}$ de cada grupo a partir de las lecturas obtenidas de cada uno de los grupos; con esto se calculó el promedio y error estándar. Y con éstos valores se construyeron las gráficas, y se calculó el % inhibición de los grupos.

La diferencia global entre los grupos estudiados se evaluó con el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar si existían diferencias significativas entre ellos. Con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni en el caso que los datos fueran paramétricos, en caso contrario se realizó un ANOVA Kruskal-Wallis para determinar entre cuales grupos existía diferencia significativa. Se estableció el nivel de significancia de 0.05.^{7,27}

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 OXIDACIÓN DEL SUERO: DIENOS CONJUGADOS

En la tabla 6 se muestra los datos de los sujetos humanos a partir de los cuales se obtuvo la sangre para la obtención del suero; donde se observa que los sujetos en estudio varían en edad, peso y sexo.

Tabla 6. Datos de los sujetos

		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.

Para completar los datos de los sujetos en estudio, se realizó un análisis bioquímico del suero con exámenes de glucosa, colesterol y triglicéridos. En donde se observa que los cinco sujetos tienen valor normal de los parámetros (tabla 7). Así también se anexa un promedio con error estándar, el cual cae dentro de los niveles normales de cada uno de los exámenes realizados.

Tabla 7. Datos de los exámenes de los sueros en estudio

	Glucosa Ref: 70-110 mg/dL	Colesterol Ref: 0-200 mg/dL	Triglicéridos Ref: 30-200 mg/dL
1	84	209	116
2	77	119	74
3	77	137	76
4	81	186	120
5	92	169	81
n=5 Media ± EE	82.2 ± 2.8	164 ± 16.3	93.4 ± 10.1

- Efecto del extracto acuoso de ajo; con y sin tratamiento térmico a ebullición previo a su elaboración; sobre la oxidación de las lipoproteínas en suero.

En la figura 4 se muestran un ejemplo de las gráficas de oxidación de las lipoproteínas del suero.

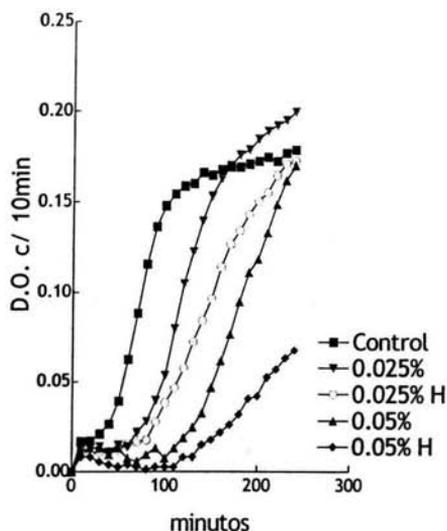


Fig 4. Efecto del extracto acuoso del ajo, con y sin tratamiento térmico previo a ebullición por 10 min, sobre la oxidación de las lipoproteínas en suero.

En la figura 5 se muestran de manera gráfica los valores de los parámetros estudiados en la cinética de oxidación de las lipoproteínas del suero, y en la tabla 8 se muestran los resultados de las diferentes concentraciones de diente de ajo, utilizando un 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 ajo, al igual que la pendiente. Se observa que el calentamiento no afecta ninguno de los parámetros mencionados anteriormente.

Ajo hervido

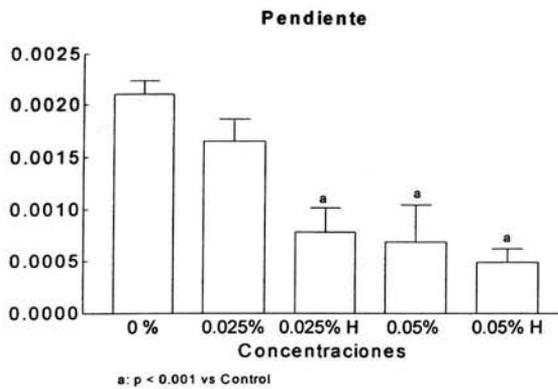
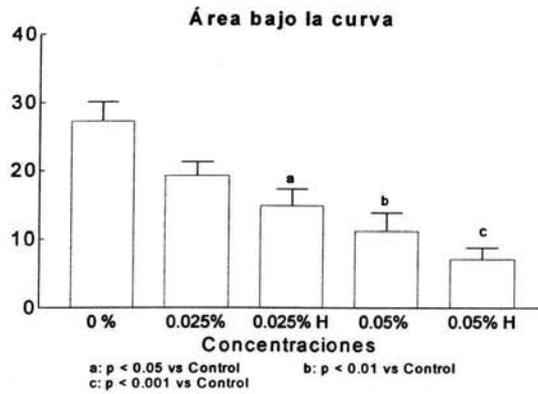
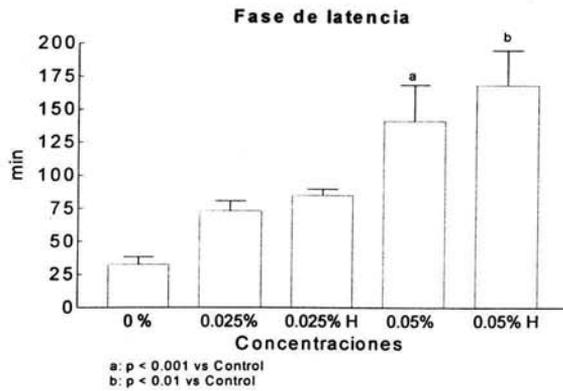


Fig 5. Gráficas de los parámetros estudiados en la cinética de oxidación de las lipoproteínas en suero, inducida por Cu^{2+} .

Tabla 8. Efecto del extracto acuoso de diente de ajo, hervido y no hervido, sobre la oxidación de las lipoproteínas en suero.

	◊ Fase de latencia (minutos)	◊ Área bajo la curva	◊ Pendiente de la fase de propagación
Control	32.67 ± 5.44	27.29 ± 2.83	0.0021 ± 0.0001
0.025%	73.12 ± 7.45	19.19 ± 2.05	0.0016 ± 0.0002
0.025% H	84.78 ± 4.51	14.77 ± 2.48	0.00078 ± 0.0002
0.05%	141.1 ± 27.46	11.10 ± 2.64	0.00069 ± 0.0003
0.05% H	168.5 ± 26.51	7.1 ± 1.7	0.00049 ± 0.0001

n=5, Media ± EE

- Efecto del extracto acuoso de ajo; con y sin tratamiento térmico en microondas previo a su elaboración; sobre la oxidación de las lipoproteínas en suero

En la figura 6 se muestran un ejemplo de las gráficas de oxidación de las lipoproteínas del suero.

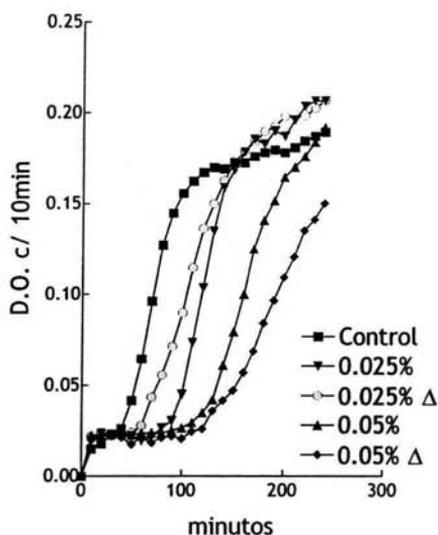


Fig 6. Efecto del extracto acuoso del ajo, con y sin tratamiento térmico previo en microondas por 60 s, previo a su elaboración, sobre la oxidación de las lipoproteínas en suero.

En la figura 7 se muestran de manera gráfica los valores de los parámetros estudiados en la cinética de oxidación de las lipoproteínas del suero, y en la tabla 9 se muestran los resultados de las diferentes concentraciones de diente de ajo, utilizando un análisis de varianza paramétrico y la prueba de Bonferroni (comparación múltiple entre grupos). El comportamiento que sigue este extracto es muy similar al anterior; donde el área bajo la curva disminuye cuando aumenta la concentración de los extractos acuosos de ajo. La fase de latencia aumenta con respecto a la concentración. La pendiente de la fase de propagación sólo disminuye significativamente a concentraciones altas.

Ajo microondas

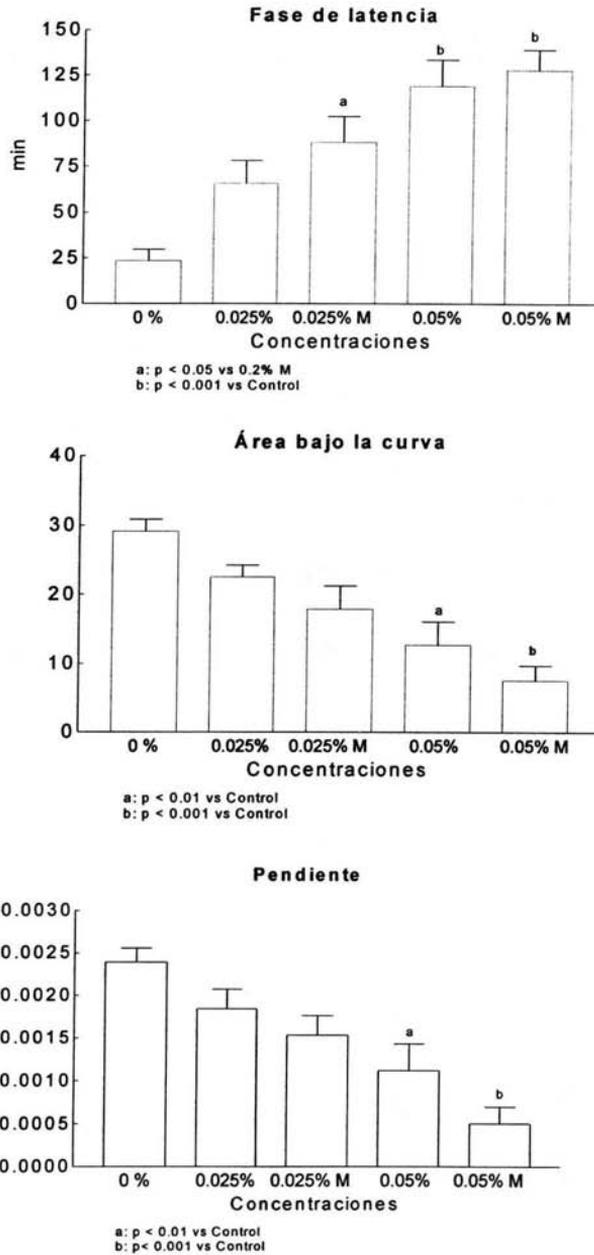


Fig 7. Gráficas de los parámetros estudiados en la cinética de oxidación de las lipoproteínas en suero, inducida por Cu^{2+} .

Tabla 9. Efecto del extracto acuoso de ajo, con y sin calentamiento en microondas, sobre la oxidación de las lipoproteínas en suero

	◊ Fase de latencia (minutos)	◊ Área bajo la curva	◊ Pendiente de la fase de propagación
Control	23.42 ± 6.2	29.12 ± 1.73	0.0024 ± 0.0002
0.025%	65.7 ± 12.5	22.5 ± 1.72	0.0018 ± 0.0002
0.025% Δ	88.2 ± 14.2	17.8 ± 3.35	0.0015 ± 0.0002
0.05%	119 ± 14.7	12.6 ± 3.43	0.0011 ± 0.0003
0.05% Δ	128.1 ± 11.3	7.5 ± 2.25	0.0005 ± 0.0002

n=5, Media ± EE

- Efecto del extracto acuoso de ajo; con y sin tratamiento en escabeche previo a su elaboración; sobre la oxidación de las lipoproteínas en suero

En la figura 8 se muestran un ejemplo de las gráficas de oxidación de las lipoproteínas del suero.

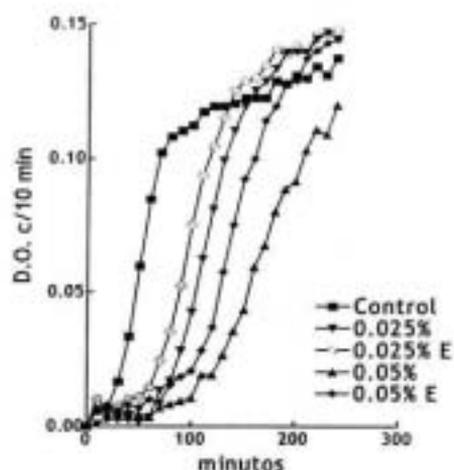


Fig 8. Efecto del extracto acuoso del ajo, con y sin tratamiento en escabeche, previo a su elaboración, sobre la oxidación de las lipoproteínas en suero.

En la figura 9 se muestran de manera gráfica los valores de los parámetros estudiados en la cinética de oxidación de las lipoproteínas del suero, y en la tabla 10 se muestran los resultados de las diferentes concentraciones de diente de ajo, utilizando un análisis de varianza paramétrico y la prueba de Bonferroni (comparación múltiple entre grupos). El comportamiento que siguen este extracto es muy similar a los anteriores (ajo con y sin hervir, y microondas); donde el área bajo la curva y la pendiente de la fase de propagación disminuye cuando aumenta la concentración de los extractos acuosos de ajo. La fase de latencia aumenta con respecto a la concentración. Se observa que el calentamiento no afecta ninguno de los parámetros mencionados anteriormente.

Ajo escabeche

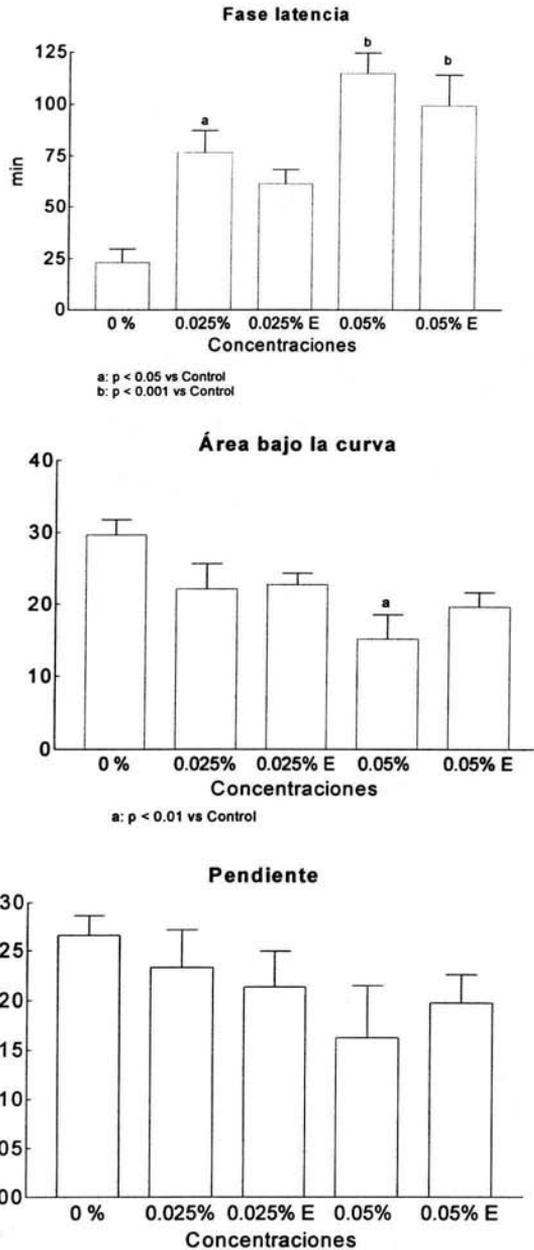


Fig 9. Gráficas de los parámetros estudiados en la cinética de oxidación de las lipoproteínas en suero, inducida por Cu^{2+} .

Tabla 10. Efecto del extracto acuoso de ajo, con y sin tratamiento en escabeche, sobre la oxidación de las lipoproteínas en suero

	◆ Fase de latencia (minutos)	◆ Área bajo la curva	◆ Pendiente de la fase de propagación
Control	23.11 ± 6.577	29.67 ± 2.07	0.0026 ± 0.0002
0.025%	76.69 ± 10.74	22.08 ± 3.57	0.0023 ± 0.0003
0.025% E	61.54 ± 7.04	22.71 ± 1.6	0.0021 ± 0.0003
0.05%	114.8 ± 9.8	15.15 ± 3.39	0.0016 ± 0.0005
0.05% E	99.29 ± 14.78	19.64 ± 1.98	0.0019 ± 0.0003

n=5, Media ± EE

Al continuar con este estudio, se siguieron las condiciones óptimas ya establecidas para la técnica de oxidación de las lipoproteínas en suero (PBS 20 mM-pH 7.4, CuSO_4 12.5 μM , suero diluido al 0.67% en PBS, O_2 disuelto a saturación). Esto con el fin de que los resultados obtenidos en este experimento fueran comparables con los anteriores.

Es importante recalcar, que el número de centrifugaciones del extracto acuoso de ajo es relevante, ya que éste debe estar libre de partículas suspendidas para que no se interfiera en las lecturas espectrofotométricas UV, y esto no cause una alteración en la cinética de oxidación. El suero así mismo debe centrifugarse tres veces para que no cause interferencia¹.

En el presente estudio se evaluó el efecto que tienen diversos tratamientos térmicos sobre las propiedades del ajo antes de realizar su extracto, sobre la oxidación de las lipoproteínas en suero. Las variables empleadas fueron: área bajo la curva, fase de latencia y pendiente de la fase de propagación de la curva de oxidación. En el cual se emplearon dos concentraciones de cada extracto (con y sin tratamiento), esto con el fin de compararlos.

Con respecto al ajo hervido, se observa un efecto de inhibición de oxidación sobre las lipoproteínas del suero humano inducida por Cu^{2+} . Así mismo como en el estudio anterior, se ve que el efecto es dependiente de la concentración, es decir a mayor concentración mayor protección.

La fase de latencia, está aumentada con respecto a la concentración del extracto acuoso, es decir hay una mayor resistencia a la oxidación de las lipoproteínas en suero inducida por Cu^{2+} , mostrándose una diferencia significativa en las

concentraciones más altas (0.05% y 0.05% H). Al aumentar la concentración del extracto acuoso, el área bajo la curva disminuye, lo que indica inhibición de la oxidación de las lipoproteínas en suero, ya que la concentración de dienos conjugados es menor; donde todas las concentraciones fueron significativamente diferentes al control, excepto la 0.025%. En cuanto a las pendientes de la fase de propagación disminuyeron al igual que el área bajo la curva encontrándose diferencia significativa en todas excepto al 0.025%. (Ver figura 5)

Con respecto al ajo sometido a microondas por 60 s antes de la elaboración del extracto, se observa un efecto de inhibición de oxidación de las lipoproteínas del suero humano inducida por Cu^{2+} . Al igual que en el ensayo anterior, éste fue dependiente de la concentración. Esto se confirma con las variables estudiadas.

La fase de latencia aumenta con respecto a la concentración del extracto acuoso, es decir hay una mayor resistencia a la oxidación de las lipoproteínas en suero inducida por Cu^{2+} , mostrándose una diferencia significativa en todas las concentraciones exceptuando al 0.025%. En cuanto a área bajo la curva, ésta disminuye con respecto a la concentración, siendo diferentes significativamente al control las concentraciones más altas (0.05% y 0.05% Δ). En cuanto a las pendientes de la fase de propagación, se encontró que las concentraciones mas grandes (0.05% y 0.05% Δ) fueron diferentes significativamente con respecto al control (ausencia de extracto), lo cual nos indica que se retardo la oxidación de las lipoproteínas en el suero humano. (Ver figura 7)

Por último, en el ajo en escabeche, se observa un efecto de inhibición de oxidación a las lipoproteínas del suero humano inducida por Cu^{2+} . Y al igual que

en los ensayos anteriores, éste fue dependiente de la concentración. La fase de latencia en cambio, mostró diferencia significativa a valores altos de concentración (0.05% y 0.05% E), e incluso a la concentración baja sin tratamiento previo (0.025%); esto contra el control. El área bajo la curva disminuyó, directamente proporcional con la concentración, obteniéndose una diferencia significativa con respecto al control sólo en la concentración alta sin tratamiento previo (0.05%). En cuanto a la pendiente de la fase de propagación, ésta permanece constante, y no se encontró diferencia significativa entre estas, ya que las curvas de cinética siguieron la misma tendencia, esto se observa en la gráfica de pendientes de la figura 9.

Así mismo se vio por los resultados obtenidos, en las diferentes variables que el calentamiento anterior a la extracción; ya sea a ebullición (10 min), microondas (60 s) o escabeche; no afectó la capacidad del ajo de inhibir la oxidación de las lipoproteínas en el suero humano, inducida por Cu^{2+} . Ya que en ninguno de los ensayos realizados se encontró diferencia significativa entre las mismas concentraciones con tratamiento y sin tratamiento. Este punto es de alta importancia, ya que el ajo es frecuentemente usado para cocinar, o incluso se ingiere de manera directa, como es el caso del ajo en escabeche.

Diversas investigaciones, nos muestran información de que el tratamiento térmico previo, disminuye o incluso anula sus propiedades; pero también que este tratamiento no afecta significativamente sus propiedades.

Así mismo al someter al ajo a un tratamiento térmico previo a su extracción, la alinasa se inhibe, al igual que en el escabeche por el pH tan bajo; por lo tanto la

alicina no se forma. Lo cual nos lleva a investigar más a fondo las propiedades del compuesto organosulfurado más abundante del ajo, la alicina. En algunas investigaciones se ha demostrado que este compuesto es capaz de inhibir la síntesis de colesterol⁹.

6.2 ENSAYO PARA DETERMINAR SI LOS EXTRACTOS DE AJO SON CAPACES DE QUELAR Cu^{2+} USANDO EL SISTEMA XANTINA-XANTINA OXIDASA

- Efecto del extracto acuoso de diente de ajo crudo sobre la inhibición de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} .

En la tabla 11 se muestran los datos obtenidos a 560 nm, así como el % de inhibición. El efecto inhibitorio del sistema es dependiente de la concentración, y los extractos de ajo son incapaces de restaurar la actividad de la enzima cuando se corre el sistema en presencia de Cu^{2+} . Lo cual puede verse representado en la figura 10.

Tabla 11. Efecto del extracto acuoso de ajo crudo sobre la inhibición de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} a 560 nm.

Grupos	560 nm	% Inhibición	560 nm	% Inhibición
	- Cu^{2+}		+ Cu^{2+}	
Control	0.0135		0.0001	99.5
Diente de ajo 0.025%	0.0094	30.69	0.0008	93.99
Diente de ajo 0.05%	0.0062	53.83	0.0009	93.49

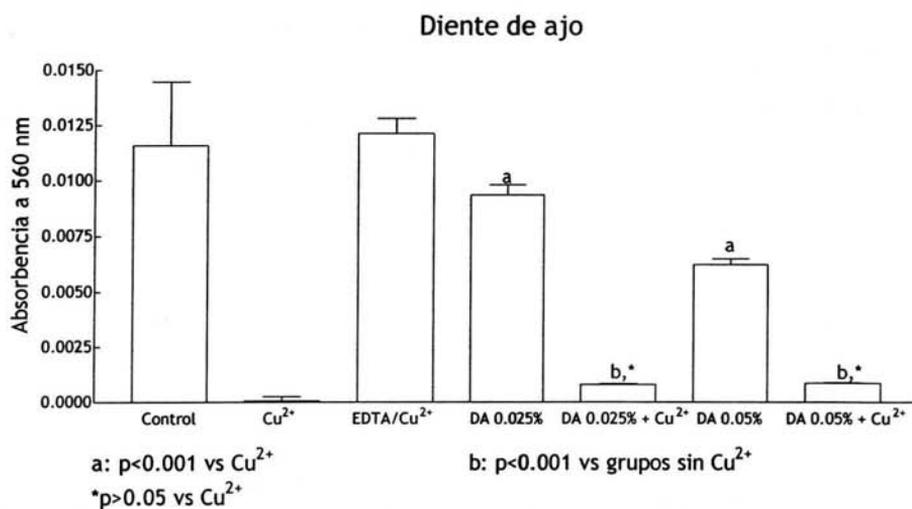


Fig 10. Efecto del extracto acuoso de ajo crudo sobre la actividad de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} medida como producción de superóxido a 560 nm.

En la tabla 12 se muestran los datos obtenidos a 295 nm, así como el % de inhibición. Los extractos de ajo son capaces de restaurar completamente la actividad de la enzima cuando se corre el sistema en presencia de Cu^{2+} a esta longitud de onda. En la figura 11 los datos se representan en barra.

Tabla 12. Efecto del extracto acuoso de ajo crudo sobre la inhibición de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} a 295 nm.

Grupos	295 nm	% Inhibición	295 nm	% Inhibición
	- Cu^{2+}		+ Cu^{2+}	
Control	0.049		0.018	63.30
Diente de ajo 0.025%	0.0603	-	0.0271	44.78
Diente de ajo 0.05%	0.0520	-	0.0283	42.29

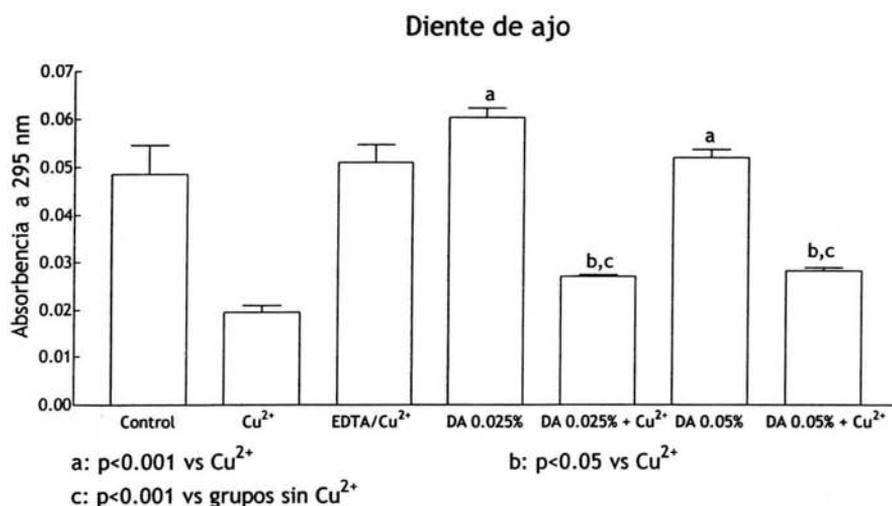


Fig 11. Efecto del extracto acuoso de ajo crudo sobre la actividad de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} medida como producción de ácido úrico a 295 nm.

En la tabla 14 se muestran los datos obtenidos a 295 nm así como el % de inhibición. El efecto inhibitorio del sistema es dependiente de la concentración y los extractos de ajo son incapaces de restaurar la actividad de la enzima cuando se corre el sistema en presencia de Cu^{2+} . Esto corrobora los datos obtenidos a 560 nm. En la figura 13 los datos se muestran en barras.

Tabla 14. Efecto del extracto acuoso de ajo hervido sobre la inhibición de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} a 295 nm.

Grupos	295 nm	% Inhibición	295 nm	% Inhibición
	- Cu^{2+}		+ Cu^{2+}	
Control	0.068		0.0145	78.71
Ajo hervido 0.025%	0.0749	-	0.0198	70.83
Ajo hervido 0.05%	0.0645	5.19	0.0194	71.45

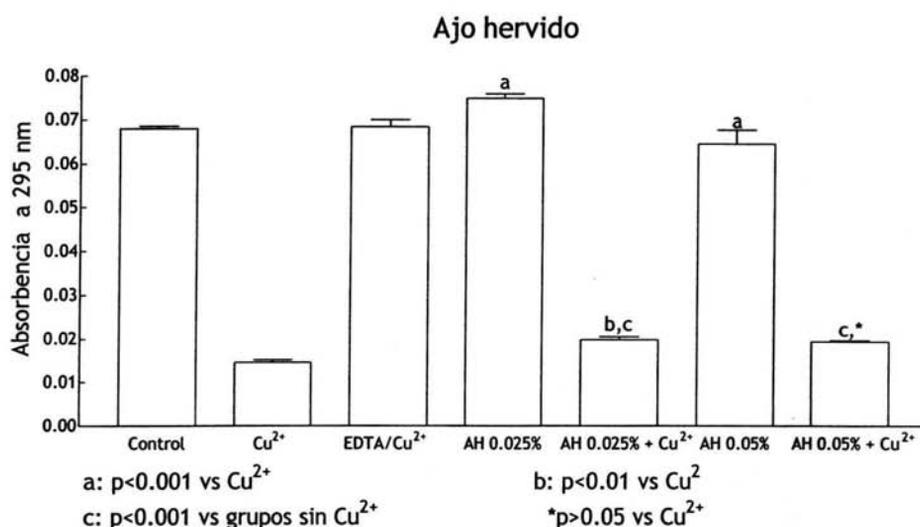


Fig 13. Efecto del extracto acuoso de ajo hervido sobre la actividad de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} medida como producción de ácido úrico a 295 nm.

- Efecto del extracto acuoso de ajo calentado en microondas sobre la inhibición de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} .

En la tabla 15 se muestran los datos obtenidos, así como el % de inhibición. El efecto inhibitorio del sistema es dependiente de la concentración, así mismo que los extractos de ajo son incapaces de restaurar la actividad de la enzima cuando se corre el sistema en presencia de Cu^{2+} . Estos datos se presentan en la figura 14.

Tabla 15. Efecto del extracto acuoso de ajo calentado en microondas sobre la inhibición de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} a 560 nm.

Grupos	560 nm	% Inhibición	560 nm	% Inhibición
	- Cu^{2+}		+ Cu^{2+}	
Control	0.028		0.0007	97.34
Ajo microondas 0.025%	0.0313	-	0.0006	97.89
Ajo microondas 0.05%	0.0257	8.05	0.0007	97.54

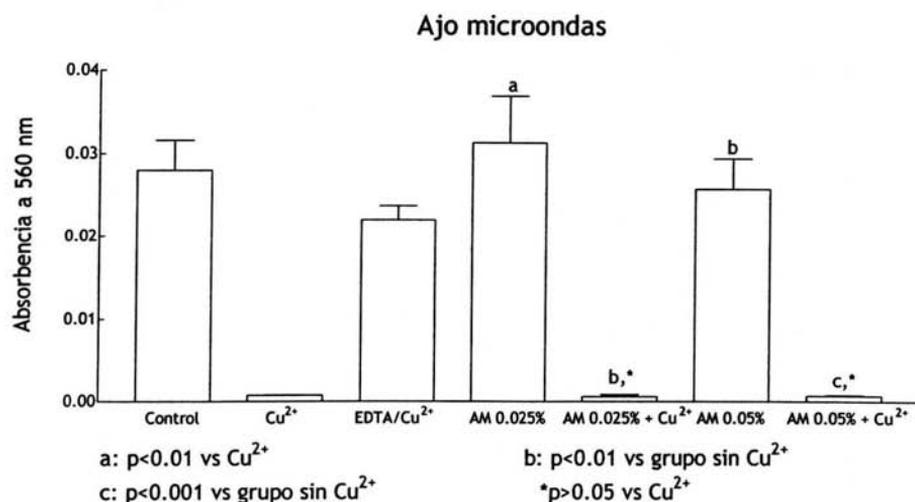


Fig 14. Efecto del extracto acuoso de ajo sometido en microondas sobre la actividad de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} medida como producción de superóxido a 560 nm.

En la tabla 16 se muestran los datos obtenidos a 295 nm así como el % de inhibición. Los extractos de ajo son incapaces de restaurar la actividad de la enzima cuando se corre el sistema en presencia de Cu^{2+} . Esto corrobora los datos obtenidos a 560 nm. En la figura 15 se muestran los datos en forma de barras.

Tabla 16. Efecto del extracto acuoso de ajo calentado en microondas sobre la inhibición de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} a 295 nm.

Grupos	295 nm	% Inhibición	295 nm	% Inhibición
	- Cu^{2+}		+ Cu^{2+}	
Control	0.068		0.0145	78.71
Ajo microondas 0.025%	0.0729	-	0.0166	75.55
Ajo microondas 0.05%	0.0721	-	0.0190	72.02

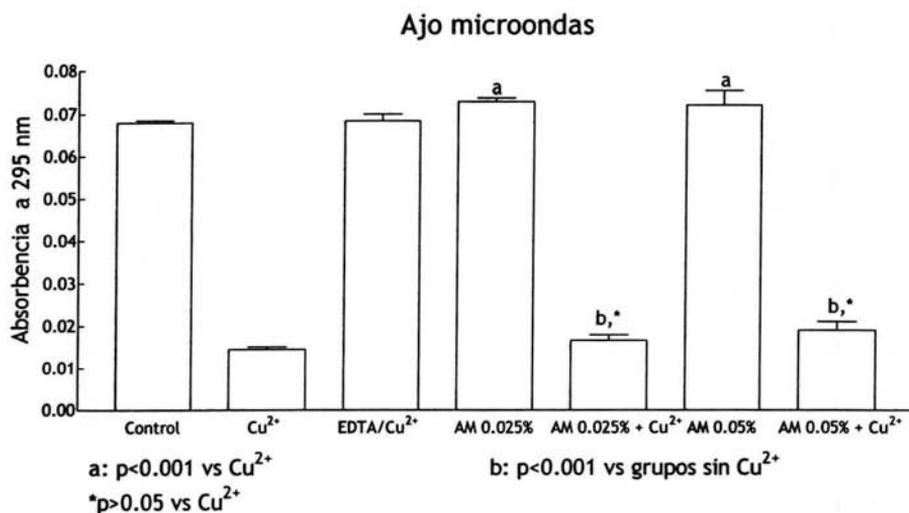


Fig 15. Efecto del extracto acuoso de ajo sometido en microondas sobre la actividad de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} medida como producción de ácido úrico a 295 nm.

- Efecto del extracto acuoso de ajo en escabeche sobre la inhibición de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} .

En la tabla 17 se muestran los datos obtenidos, así como el % de inhibición. El efecto inhibitorio del sistema es dependiente de la concentración y los extractos de ajo son incapaces de restaurar la actividad de la enzima cuando se corre el sistema en presencia de Cu^{2+} . Estos datos se presentan en la figura 16.

Tabla 17. Efecto del extracto acuoso de ajo en escabeche sobre el sistema xantina-xantina oxidasa por Cu^{2+} a 560 nm.

Grupos	560 nm	% Inhibición	560 nm	% Inhibición
	- Cu^{2+}		+ Cu^{2+}	
Control	0.028		0.0007	97.34
Ajo escabeche 0.025%	0.0387	-	0.0018	93.45
Ajo escabeche 0.05%	0.0305	-	0	99.84

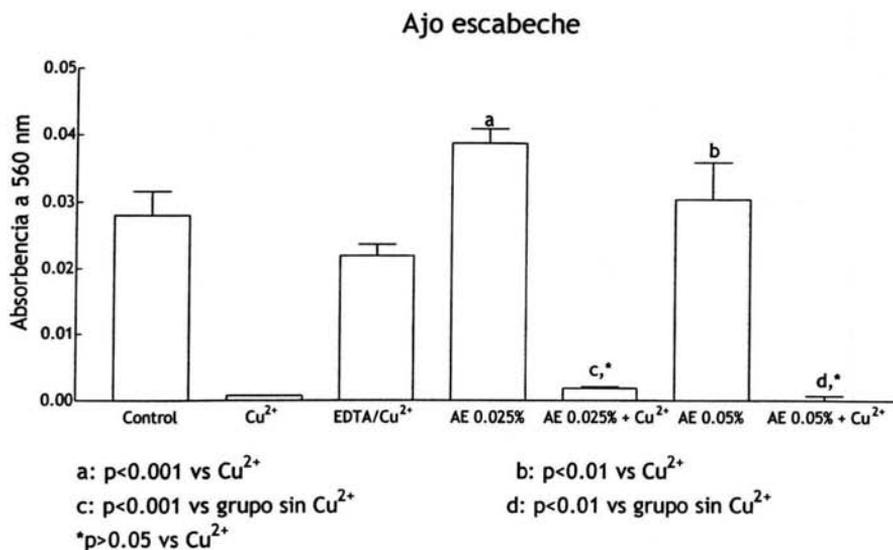


Fig 16. Efecto del extracto acuoso de ajo en escabeche sobre la actividad de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} medida como producción de superóxido a 560 nm.

En la tabla 18 se muestran los datos obtenidos a 295 nm así como el % de inhibición. El efecto inhibitorio del sistema es dependiente de la concentración y los extractos de ajo son incapaces de restaurar la actividad de la enzima cuando se corre el sistema en presencia de Cu^{2+} . Esto corrobora los datos obtenidos a 560 nm. Los datos se presentan en forma de barras en la figura 17.

Tabla 18. Efecto del extracto acuoso de ajo en escabeche sobre la inhibición de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} a 295 nm.

Grupos	295 nm	% Inhibición	295 nm	% Inhibición
	- Cu^{2+}		+ Cu^{2+}	
Control	0.068		0.0145	78.71
Ajo escabeche 0.025%	0.0708	-	0.0204	70
Ajo escabeche 0.05%	0.0601	11.68	0.0204	70

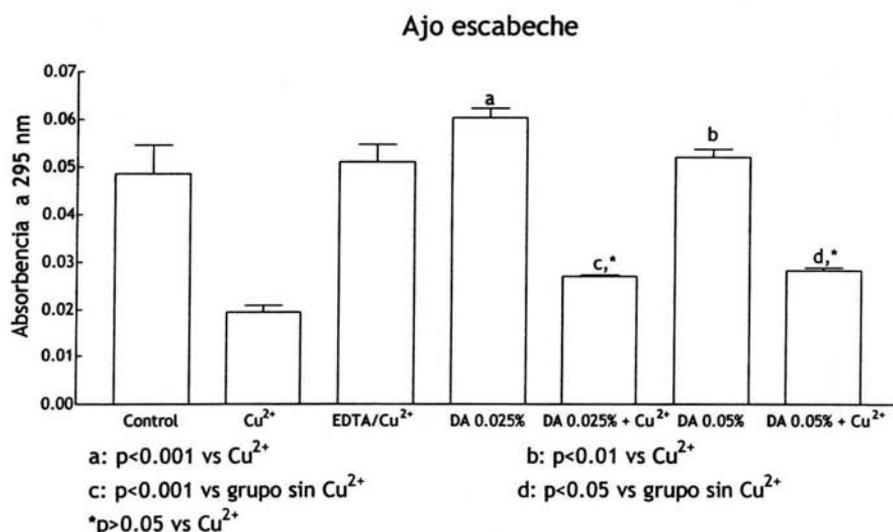


Fig 17. Efecto del extracto acuoso de ajo en escabeche sobre la actividad de la xantina oxidasa inducida por Cu^{2+} medida como producción de ácido úrico a 295 nm.

En la realización de este ensayo se utilizaron 7 grupos diferentes, en donde se corrió un control como punto de comparación, así mismo se corrieron controles positivos (Cu^{2+} y EDTA) y negativos (Cu^{2+}). Los diferentes extractos de ajo se corrieron a dos diferentes concentraciones y en presencia y ausencia del Cu^{2+} . Esto con el fin de poder observar si dichos extractos eran capaces de reestablecer la actividad de la enzima.

Se obtuvieron datos a dos longitudes de onda (295 y 560 nm) simultáneamente para corroborar el efecto de los diferentes extractos acuosos de ajo sobre el atrapamiento del Cu^{2+} , y no así sobre la actividad de la enzima.

En el primer ensayo con diente de ajo, se observa en la tabla 11 que el % de inhibición no disminuye significativamente en los grupos con el extracto de ajo en presencia de Cu^{2+} , esto indica que el ajo es incapaz de atrapar el Cu^{2+} y así reestablecer la actividad de la enzima en ninguna de sus concentraciones. Y en la tabla 12 se puede ver que la actividad de la enzima no es alterada significativamente por el extracto de ajo. En la figura 10 podemos observar que los grupos con extracto acuoso de ajo son diferentes significativamente contra el grupo de Cu^{2+} , lo cual indica que el sistema no es interrumpido por la presencia del extracto; así mismo se muestra que los grupos de extracto de ajo en presencia de Cu^{2+} no logran reestablecer la actividad del sistema, y se ve un efecto dependiente de la concentración, ya que el grupo de 0.025% no tuvo diferencia significativa contra el grupo de Cu^{2+} , a diferencia de la concentración de 0.05%. En cuanto a la figura 11 se puede ver que tiene un comportamiento

distinto al anterior, donde todos los grupos son diferentes significativamente contra el grupo con Cu^{2+} , por lo que logra reestablecer la actividad de la enzima.

En cuanto al extracto de ajo hervido, se ve una tendencia muy similar que en el caso anterior donde los extractos de ajo son incapaces de restaurar la actividad del sistema. Teniéndose diferencia significativa de los grupos en ausencia de Cu^{2+} con el grupo de Cu^{2+} y diferencia entre los grupos con y sin Cu^{2+} a la absorbencia de 560 nm. En cambio a 295 nm se tiene que el único grupo que no es diferente significativamente contra Cu^{2+} es a la concentración de 0.05%.

Con respecto al ensayo de ajo en microondas, se encontró lo mismo que en el caso del extracto de ajo hervido. Así mismo, en el caso del extracto de ajo en escabeche se encontró algo muy similar exceptuando que en el caso del extracto de ajo en escabeche a las dos concentraciones en presencia de Cu^{2+} no se observó diferencia significativa contra el grupo de Cu^{2+} .

Con base en estos resultados, podemos decir que ciertos extractos acuosos de ajo, afectan de una manera débil al sistema, por lo que se ve en los datos a 295 nm, el cambio es notorio a 560 nm, donde incluso se podría incluir que el ajo actúa también como atrapador de radical hidroxilo producido en el sistema.

En el único caso donde se encontró que el extracto acuoso de ajo posea la capacidad de atrapar al Cu^{2+} , es en el ajo crudo, lo cual se ve en la tabla 12, donde logra restituir la actividad de la enzima y se encontró diferencia significativa contra el grupo de Cu^{2+} .

En forma de resumen:

	560 nm	295 nm
Diente de ajo crudo	No quela	Si quela (en ambas concentraciones)
Ajo hervido	No quela	No quela
Ajo microondas	No quela	No quela
Ajo en escabeche	No quela	No quela

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

7. CONCLUSIONES

1. Se demostró que los extractos de ajo sometidos a diferentes tratamientos (ebullición, microondas y escabeche) mantienen su propiedad de inhibir la oxidación de las lipoproteínas en suero humano.
2. Al inhibir a la alinasa con los tratamientos térmicos, la alina, compuesto organosulfurado predominante en el diente de ajo crudo; puede ser el componente clave en el mantenimiento de la capacidad antioxidante en los tres extractos de ajo estudiados.
3. Debido a que los diferentes tratamientos térmicos no alteraron su capacidad antioxidante, esto puede dar pauta, para recomendar al ajo, aún calentado previamente, no solo como condimento, sino como medio preventivo en enfermedades cardiovasculares, como en el caso de la aterosclerosis.
4. Los cuatro extractos de ajo estudiados son incapaces de quelar Cu^{2+} , por lo tanto, este no es el mecanismo por el cual dichos extractos inhiben la oxidación de las lipoproteínas inducida por dicho metal.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Albarrán-Morán MG. Efecto de dos extractos acuosos del ajo sobre la oxidación de lipoproteínas de baja densidad en suero humano. Tesis de licenciatura, Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM, México D.F., 2003.
2. Song K, Milner JA. The influence of heating on the anticancer properties of garlic. *J Nutr* 2001;131:1054S-7S.
3. Banerjee SK, Maulik SK. Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutr J* 2002;1:4
4. [http:// www.ssa.gob.mx/](http://www.ssa.gob.mx/) (Enfermedades del corazón, primera causa de muerte en México. Comunicado de prensa No. 006 10/Enero/2002. Secretaría de Salud. México,D.F.)
5. Lau BH. Suppression of LDL oxidation by garlic. *J Nutr* 2001;131:985S-8S.
6. García-Alamilla J. La composición química del ajo y sus propiedades antioxidantes. Tesis de licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. UNAM, México D.F. 2003, pág. 1,20,58-59.
7. 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;72:1583-94.
8. Ho SE, Ide N, Lau BH. S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine* 2001;8:39-46.
9. Gupta N, Porter TD. Garlic and garlic-derived compounds inhibit human squalene monooxygenase. *J Nutr* 2001;131:1662-7.

10. Ide N, Nelson AB, Lau SH. Aged garlic extract and its constituents inhibits Cu^{2+} -induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Med* 1997;63:263-4.
11. Imai J, ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic and its constituents. *Planta Med* 1994;60:417-20.
12. Bordia T, Mohammed N, Thomson M, Ali M. An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents. *Prostaglandines Leukot Essent Fatty Acids* 1996;54:183-6.
13. Ali M. Mechanism by which garlic inhibits cyclooxygenase activity. Effect of raw versus boiled garlic extract on the synthesis of prostanoids. *Prostaglandines Leukot Essent Fatty Acids* 1995;53:397-400.
14. Prasad K, Laxdall VA, Yu M, Raney BL. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic. *Mol Cell Biochem* 1996;154:55-63.
15. Kasuga S, Uda N, Kyo E, Ushijima M, Morihara N, Itakura Y. Pharmacologic activities of aged garlic extract in comparison with other garlic preparations. *J Nutr* 2001;131:1080S-4S.
16. Kim JW, Park KE, Ko HJ, Kyung KH. Antimicrobial activity of heated garlic extract against *Staphylococcus aureus*. Session 59E, Food Microbiology: Effect Antimicrobials on Foodborne Pathogens. 1:00 PM - 4:30 PM, 2001-06-25 Room Hall D.
http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_12423.htm
17. Koch HP, Lawson LD. Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species; Williams and Wilkins: Baltimore 1996.

18. Lawson LD. Garlic. A review of its medicinal effects and indicated active compounds. En: Lawson LD y Bauer R, eds. *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity*. American Chemical Society Symposium series 691, Washington, DC 1998. pp 176-209.
19. 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.
20. Lawson LD, Wood SG, Hughes BG. Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialk(en)yl thiosulfinates in commercial garlic products. *Planta Med* 1991;57:363-70.
21. Block E, Naganathan S, Putnam D, Zhao SH. Allium chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates 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.
22. 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.
23. Lawson LD, Wang ZJ. Pre-hepatic fate of the organosulfur compounds derived from garlic (*Allium sativum*). *Planta Med* 1993;59:A688.
24. Fernández-Britto RJ, Castillo HJ, Taquechel TN, Barriuso AA, Vilaú F. Atherosclerosis, colesterol y pared arterial: algunas reflexiones. *Rev Cub Invest Biomed* 1999;18:169-75.

25. Díaz 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, Bióloga. Facultad de Ciencias, Biología. UNAM, México D.F. 1992.
26. Brown MS, Goldstein JL. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci Am* 1984;251:58-66.
27. Ou Ch, Tsao Sh, Lin M, Yin M. Protective action on human LDL against oxidation and glycation by four organosulfur compounds derived from garlic. *Lipids* 2003;38:219-24.
28. Bielski BHJ, Shule GG, Bajuk S. Reduction of nitro blue tetrazolium by $\text{CO}_2^{\cdot-}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ radicals. *J Phys Chem* 1980;84:830-33.
29. Owen PL, Johns T. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *J Ethnopharmacol* 1999;64:149-60.
30. Posadas-Sánchez R. Estudio de la función vascular en ratas nefróticas con deficiencia de antioxidantes. Tesis de maestría en ciencias (Biología celular). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 1999. Págs.16-28
31. 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;7:664-69.
32. Rengström J, Ström K, Moldeus P, Nilsson J. Analysis of lipoprotein diene formation in human serum exposed to copper. *Free Rad Res Commun* 1993;19:267-78.

33. Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ. Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem* 2003;51:1500-5.
34. Gheldof N, Engeseth NJ. Antioxidant capacity of honey 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;50:3050-55.