



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE  
EXTRACTOS DE AJO EN ESCABECHE Y DE AJO SOMETIDO  
A MICROONDAS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

**ALMA BERENICE ZUÑIGA BUSTOS**

MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

ABRIL 2005

m 343205



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:

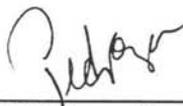
Presidente: Prof. Perla Carolina Castañeda López  
Vocal: Prof. Carlos Pérez Muñoz  
Secretario: Prof. José Pedraza Chaverri  
1er. Suplente: Prof. Raquel Ortega Muñoz  
2do. Suplente: Prof. Catalina Machuca Rodríguez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 209 de Bioquímica Clínica, 2º piso, edificio B, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

Este trabajo de investigación recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto No. 40009 M) y del subprograma 127 "Formación de profesores", Coordinación de Superación Académica, Facultad de Química, UNAM.

Asesor:



Dr. José Pedraza Chaverri

Supervisor técnico:



M. en C. Omar Noel Medina Campos

Sustentante:



Alma Berenice Zúñiga Bustos

La vida es el viaje más alucinante, maravilloso, mágico.....único, para estar en el sólo es necesario haber nacido, yo he tenido la dicha de compartirlo con ustedes a los que llamo mi gran pilar:

Son ustedes mis padres, que con sólo mencionar sus nombres se llena de dicha y orgullo mi corazón, tu madre mi confidente, tu padre mi tranquilidad.

Son ustedes mis hermanos compañeros incondicionales de toda la vida, que junto con ustedes mis primos cómplices de juegos y travesuras, aprendimos el significado de la hermandad.

Son ustedes mis abuelos prueba terrenal del gran amor de Dios para mí, con ustedes aprendí que todo en la vida tiene su razón y su tiempo.

Son ustedes mis tíos seres incansables, siempre dispuestos a alcanzar lo inalcanzable, ejemplo de fortaleza y dedicación.

Son ustedes mis amigos que en cada etapa de mi vida han dejado huellas profundas de su recorrido en mi camino, con los que he formado una red que día con día crece amortiguando las caídas.

Eres tu, joven de negra cabellera, de grandes ojos y mirada ardiente, de graciosa sonrisa y corazón paciente. A tí, te agradezco por toda la alegría, ternura, amistad, apoyo, ..... y paciencia, por todo el tiempo que has invertido pensando en mí.

Son ustedes mis maestros con los que aprendí que la ciencia es digna de admiración y contribución por que al fin y al cabo es la forma que el hombre invento para comprender la grandeza infinita de Dios.

Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecerles a todos ustedes una vida llena de felicidad, consejos y enseñanzas, solo deseo que sepan que un logro mío, es el logro de todos nosotros, por que gracias al amor, apoyo y confianza que en mí depositaron he logrado culminar uno de los anhelos más grandes de mi vida.

Sientanse orgullosos de la mujer que han formado.

Por lo que ha sido y será..... Gracias.



Todo lo puedo en Cristo  
que me fortalece Fil. 4:6

## ÍNDICE.

1.	Resumen.	4
2.	Introducción.	6
2.1	Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en organismos aerobios.	6
	2.1.1 El oxígeno, precursor de especies reactivas.	6
	2.1.2 Las ERO subproductos del metabolismo aerobio.	7
	2.1.3 La NADPH-oxidasa.	8
	2.1.4 La xantina-oxidoreductasa.	8
	2.1.5 El ciclo de Haber-Weiss y la reacción de Fenton.	9
2.2	Dualidad fisiológica de las ERO.	10
2.3	Daño oxidativo en macromoléculas.	11
	2.3.1 Efecto sobre los lípidos.	11
	2.3.2 Efecto sobre las proteínas.	11
	2.3.3 Efecto sobre los ácidos nucleicos.	12
2.4	Defensa antioxidante en la célula.	13
	2.4.1 Enzimas antioxidantes.	14
	2.4.1.1 Superóxido dismutasa (SOD).	14
	2.4.1.2 Catalasa (CAT).	15
	2.4.1.3 Glutatión peroxidasa (GPX).	15
	2.4.2 Mecanismos antioxidantes no enzimáticos.	17
	2.4.2.1 Sistema antioxidante del glutatión.	17
	2.4.2.2 Ciclo del ascorbato-glutatión.	17
2.5	El estrés oxidativo y enfermedades relacionadas.	18
	2.5.1 Causa-efecto.	19
2.6	<i>Allium sativum</i>	20
2.7	Propiedades medicinales del ajo.	20
	2.7.1 El ajo y las enfermedades cardiovasculares.	20
	2.7.2 El ajo y el cáncer.	20
	2.7.3 El ajo y la función cerebral, en el envejecimiento.	21
2.8	Propiedades antioxidantes del ajo.	22
	2.8.1 La composición del ajo y los compuestos organosulfurados.	22

	2.8.2 Extractos de ajo crudo.	24
2.9	Inhibición de la alinasa y sus consecuencias.	25
	2.9.1 La alina.	25
	2.9.2 Extracto de ajo hervido.	26
	2.9.3 Extracto de ajo microhorneado.	26
3.	Justificación.	28
4.	Hipótesis.	29
5.	Objetivos.	29
6.	Metodología	30
6.1	Materiales y métodos.	30
	6.1.1 Reactivos.	30
6.2	Preparación de los extractos de ajo.	30
	6.2.1 Extracto de ajo crudo (EAC).	30
	6.2.2 Extracto de ajo en escabeche (EAEsc).	31
	6.2.3 Extracto de ajo microhorneado (EAM).	32
6.3	Preparación de los estándares atrapadores de ERO.	32
	6.3.1 Piruvato.	32
	6.3.2 Ácido nordihidroguayarático (NDGA).	33
	6.3.3 Dimetil tiourea (DMTU).	33
6.4	Valoración espectrofotométrica de la capacidad antioxidante.	34
	6.4.1 Evaluación de la capacidad atrapadora de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por los extractos de ajo mediante el ensayo de $Fe^{3+}$ -naranja de xilenol (FOX).	34
	6.4.2 Evaluación de la capacidad atrapadora de anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) por los extractos de ajo a partir del sistema xantina/xantina oxidasa.	37
	6.4.3 Evaluación de la capacidad atrapadora del radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) por los extractos de ajo a partir del sistema del $Fe^{3+}$ -EDTA- $H_2O_2$ -desoxirribosa.	39
	6.5 Análisis estadístico.	42
7.	Resultados.	43
	7.1. Peróxido de hidrógeno.	43
	7.2 Anión superóxido.	45
	7.3 Radical hidroxilo.	48
8	Discusión.	50
9.	Conclusiones.	52

10.	Referencias.	53
11.	Apéndice.	60
	11.1 Lista de reactivos, preparación de soluciones y curva estándar, empleados en el ensayo $\text{Fe}^{3+}$ -naranja de xilenol (FOX).	60
	11.2 Lista de reactivos y preparación de soluciones, empleados en el sistema xantina/xantina oxidasa.	61
	11.3 Lista de reactivos, preparación de soluciones y curva estándar, empleados en el sistema del $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA- $\text{H}_2\text{O}_2$ -desoxirribosa.	62

---

## 1. RESUMEN.

El estrés oxidativo es una condición que se puede presentar en los organismos aerobios debido a la pérdida del equilibrio entre los factores oxidantes como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), etc y las defensas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPX), la vitamina C, la vitamina E, el glutatión (GSH), etc. Durante el estrés oxidativo las macromoléculas biológicas pueden sufrir daños, lo cual puede traer consecuencias graves a la viabilidad celular.

El ajo (*Allium sativum*, L.) al contener sustancias con actividad antioxidante puede prevenir disfunciones relacionadas con el estrés oxidativo como son enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas e incluso el cáncer. Los compuestos organosulfurados contenidos en el ajo como las  $\gamma$ -glutamilcisteínas, los sulfóxidos de cisteína (alina), los tiosulfatos (alicina) y los polisulfuros, como el dialil disulfuro (DADS), entre otros, son los constituyentes a los que se les atribuyen las propiedades antioxidantes del ajo. Su variedad y concentración está en función de la actividad de la alinasa, una enzima que al ser liberada por la destrucción de la estructura celular del ajo desencadena, a partir de la alina, la formación de la alicina y sus derivados, los polisulfuros.

Todas las publicaciones que refieren a la evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de ajo crudo donde la alinasa permanece activa tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* han sido congruentes reconociendo a dicho extracto como un excelente antioxidante ya que es capaz de inhibir la lipoperoxidación, de atrapar  $H_2O_2$  y de inhibir la producción de  $OH^{\cdot}$ , además de su acción anticancerígena y preventiva en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Por otra lado también ha sido evaluada la capacidad antioxidante de extractos de ajo donde la alinasa fue inactivada, generándose una vertiente en cuanto al mantenimiento o disminución de la actividad antioxidante de dichos extractos con respecto a la actividad del extracto de ajo crudo, así tenemos estudios donde se manifiesta que se reduce su capacidad para inhibir la producción de  $OH^{\cdot}$  y algunos de sus efectos anticancerígenos, pero también se sabe de publicaciones donde se reporta que la inactivación de la alinasa en los extractos de ajo no afecta su capacidad de inhibir la oxidación de las lipoproteínas en suero humano y que además no disminuye su capacidad de atrapar a el  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  y  $H_2O_2$ .

---

Ante dicha controversia surge el presente trabajo que pretende ser un sustento que sirva para establecer con certeza la participación de la actividad de la alinasa en la conservación de las propiedades antioxidantes del ajo.

Los objetivos propuestos son 1) Determinar la cantidad de extracto de ajo crudo (EAC), extracto de ajo en escabeche (EAEsc) y extracto de ajo microhorneado (EAM) necesaria para inhibir o atrapar el 50% de la concentración inicial de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  y  $H_2O_2$ , valor conocido como  $CI_{50}$ ; 2) Determinar el efecto en la capacidad antioxidante del ajo al inhibir a la alinasa y 3) Determinar la eficacia del EAC con respecto a compuestos reconocidos por su actividad antioxidante (Piruvato, NDGA y DMTU). Para alcanzar el primer objetivo se hicieron ensayos concentración-repuesta, en los cuales se contaba con una concentración constante de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^{\cdot}$ , utilizando como método de detección y/o de generación los sistemas xantina/xantina oxidasa, el ensayo del  $Fe^{2+}$ -naranja de xileno (FOX) y el sistema del  $Fe^{3+}$ -EDTA- $H_2O_2$ -desoxirribosa respectivamente y la posterior cuantificación del  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  y  $H_2O_2$  remanente al adicionar cantidades crecientes de EAC (alinasa activa), EAEsc y EAM (alinasa inactiva), también se sometió al mismo ensayo a la dimetil tiourea (DMTU), el ácido nordihidroguayarático (NDGA) y el piruvato compuestos puros reconocidos por su capacidad para atrapar al  $OH^{\cdot}$ ,  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ , respectivamente con lo que se cubre el tercer objetivo, por último se calculó la  $CI_{50}$  valor que nos permitió cumplir el segundo objetivo.

Como resultados tenemos que el EAEsc resultó tener una capacidad de atrapamiento frente al  $H_2O_2$ , el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $OH^{\cdot}$  equivalente a la del EAC, mientras que el EAM tiene una capacidad de atrapamiento frente al  $OH^{\cdot}$  similar a la del EAC, una capacidad de atrapamiento 43% más efectiva para atrapar el  $H_2O_2$  y una capacidad 75% menos efectiva para atrapar el  $O_2^{\cdot-}$  y que el NDGA, la DMTU y el piruvato resultaron ser 690, 2 y 1.5 veces más eficaces que el EAC, respectivamente.

Finalmente el presente estudio *in vitro* sugiere que (1) la capacidad para atrapar las ERO del EAC, el EAEsc y el EAM no está relacionada con la actividad de la alinasa, y que (2) el compuesto o los compuestos involucrados en la capacidad antioxidante de los extractos de ajo son estables al calentamiento.

## 2. INTRODUCCIÓN.

### 2.1 Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en organismos aerobios.

#### 2.1.1 El oxígeno, precursor de especies reactivas.

La baja reactividad del oxígeno molecular ( $O_2$ ) es de vital importancia, ya que de lo contrario, todas las moléculas esenciales para la vida serían oxidadas, sin embargo éste puede ser convertido en otras especies con mayor reactividad ya sea por transferencia de energía o por reacciones de transferencia de electrones (Klotz, 2002). Algunas de las especies reactivas a las que da origen el  $O_2$  son: el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) (Fridovich, 1999), como resultado de la reducción secuencial del  $O_2$  (Klotz, 2002) (Figura I).

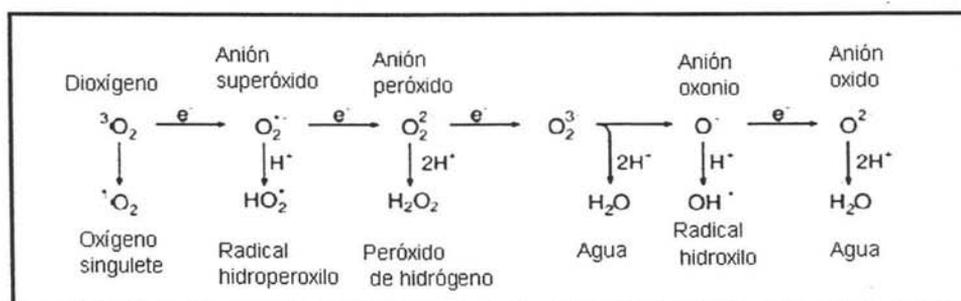


Figura I. Generación de diferentes ERO por transferencia de energía o reducción univalente secuencial a partir del oxígeno triplete molecular (Apel & Hirt, 2004).

La reactividad de los átomos y moléculas puede explicarse en parte con los valores de potencial de reducción, partiendo de que a valores crecientes positivos de potencial la capacidad de aceptar electrones se incrementa y con ello su reactividad, podemos ahora sustentar el incremento en la reactividad del  $O_2^{\cdot-}$  y el  $H_2O_2$  con respecto al  $O_2$ , cuyos potenciales son 0.94 V, 0.38 V (Imlay, 2003) y -0.16 V (Rice-Evans *et al.*, 1980), respectivamente.

Hasta ahora hemos descrito al  $O_2$ , sus especies derivadas y su reactividad fuera del contexto biológico, lo cual no es correcto ya que el  $O_2$  es un elemento esencial para las formas de vida aerobias, debido a que su consumo está acoplado a la producción de energía mediante la síntesis de ATP (Nelson & Cox, 2000), este proceso se conoce como fosforilación oxidativa y forma parte del metabolismo aerobio el cual produce irremediablemente ERO (Klotz, 2002).

### 2.1.2 Las ERO subproductos del metabolismo aerobio.

La mitocondria es la principal fuente de producción de ERO (Lesnefsky *et al.*, 2001; Wallace, 2000) debido a que en dicho organelo ocurre la fosforilación oxidativa, el inicio del sistema de transporte de electrones lleva a la formación de  $O_2^{\cdot-}$  (Loschen *et al.*, 1971; Boveris & Cadenas, 1975) las enzimas involucradas en dicho proceso son las deshidrogenasas, las transferasas de electrones, las oxidasas y las mono-oxigenasas (Fridovich, 1999; Massey, 1994).

El complejo I de la mitocondria (sitio NADH deshidrogenasa) y en el complejo III (sitio  $Q_i$ ) descargan ERO directamente a la matriz donde son detoxificadas por las defensas antioxidantes de la matriz como son la superóxido dismutasa (MnSOD), el glutatión (GSH), la glutatión peroxidasa (GPX) y la glutatión reductasa (GR), mientras que el sitio  $Q_o$  del complejo III libera las ERO en el espacio intermembranal lejos de las defensas antioxidantes de la matriz, favoreciendo su liberación al exterior de la mitocondria en el citosol (Chen *et al.*, 2003) (Figura III).

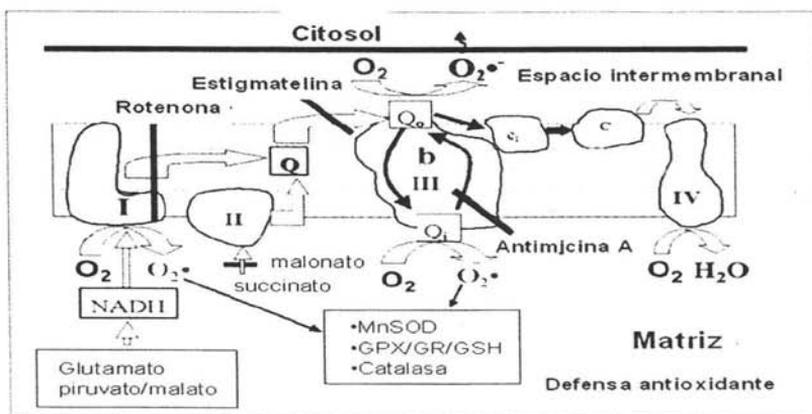


Figura III. Descripción de la cadena de transporte de electrones mostrando los sitios de generación de ERO (Chen *et al.*, 2003).

Si bien la mitocondria es una importante fuente de ERO, también es cierto que otras enzimas como la NADPH oxidasa (Griendling *et al.*, 2000) y la xantina oxidoreductas (Pritsos, 2000; Harrison, 2002), por mencionar solo algunas, contribuyen en gran medida en la producción de dichas especies.

### 2.1.3 La NADPH-oxidasa.

Las NADPH-oxidases catalizan la producción de  $O_2^{\cdot -}$  al transferir un electrón, que va del NADPH al  $O_2$ , debido a esto dicha enzima es la mayor fuente de  $O_2^{\cdot -}$  (Babior, 1999). Está enzima se encuentra en neutrófilos, células endoteliales vasculares y trofoblastos (Griendling *et al.*, 2000; Matsubara & Sato, 2001). Su actividad es regulada por hormonas como la angiotensina II, los factores de crecimiento y la trombina; por citocinas como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ; por fuerzas hemodinámicas y por cambios metabólicos locales resultando en un aumento de la generación de  $O_2^{\cdot -}$  (Griendling *et al.*, 2000).

### 2.1.4 La xantina oxidoreductasa.

La xantina oxidoreductasa (XOR) pertenece a la familia de las molibdoenzimas y es mejor conocida por su participación en la degradación de la purina, esta enzima cataliza la conversión de la hipoxantina en xantina y de xantina en ácido úrico con la producción simultanea de  $O_2^{\cdot -}$  (Berry & Hare, 2003) (Figura IV).

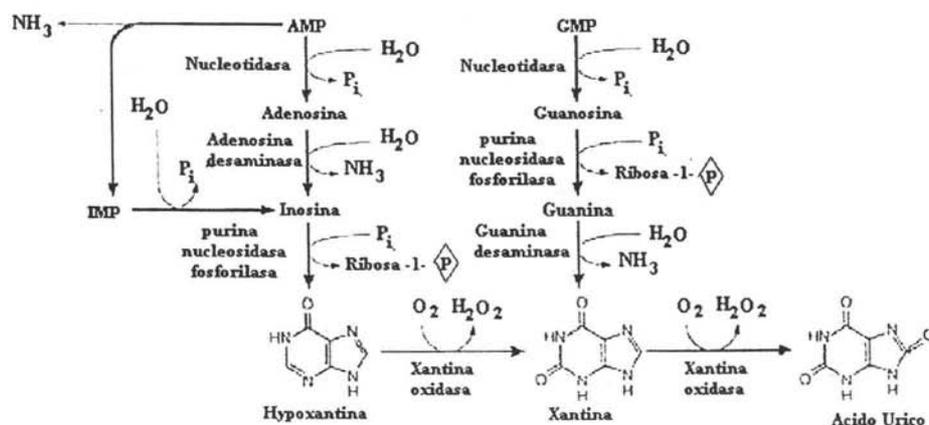


Figura IV. Vía de la degradación de las purinas (Mathews & Van Holde, 1996).

---

La XOR acepta dos electrones donados por la xantina (Xia *et al.*, 1999), los cuales son transferidos al oxígeno molecular generándose así el  $O_2^{\cdot-}$  (Olson *et al.*, 1974; Hille & Massey, 1981)

Los niveles más altos en cuanto a actividad para esta enzima se han reportado en hígado e intestino delgado (Parks & Granger, 1986). Recientes estudios han demostró la presencia de la XOR en el citoplasma (Rouquette *et al.*, 1998; Frederiks & Vreeling-Sindelarova, 2002) y sobre las membranas celulares (Rouquette *et al.*, 1998) unidas a glucosaminoglucanos (Adachi *et al.*, 1993; Radi *et al.*, 1997; Rouquette *et al.*, 1998). Así mismo, diversos estudios han permitido identificar a la XOR como proteína y/o actividad en corazón humano (Muxfeldt & Schaper, 1987; Abadeh *et al.*, 1993; Vickers *et al.*, 1998; Cappola *et al.*, 2001), las ratas knockout para la XOR raramente sobreviven más de 6 semanas, lo que sugiere una gran importancia para los mamíferos inferiores (Vorbach *et al.*, 2002).

Hasta ahora solo se han descrito diversas formas de producción de  $O_2^{\cdot-}$  por lo que la pregunta inmediata es y entonces como se originan el  $H_2O_2$  y el  $OH^{\cdot}$ ; en primera instancia la superóxido dismutasa (SOD) en un intento por detoxificar al  $O_2^{\cdot-}$  genera  $H_2O_2$  el cual puede ser detoxificado por acción de la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX) o bien usado como sustrato en la reacción de Fenton para dar origen al  $OH^{\cdot}$  (los mecanismos de acción de la SOD, CAT y GPX serán vistos a detalle en temas posteriores).

Se sabe que la presencia de metales de transición, de moléculas orgánicas ricas en electrones, o de radiación ionizante (Harrison, 1980; Rice-Evans *et al.*, 1980) acelera la producción de ERO, el ciclo de Haber-Weiss y la reacción de Fenton son un ejemplo de eventos en los que su iniciación depende de la presencia de metales de transición como el Fe y el Cu. A continuación se aborda el tema.

### ***2.1.5 El ciclo de Haber-Weiss y la reacción de Fenton.***

El  $H_2O_2$  en presencia de Fe o Cu puede llevar a la generación del  $OH^{\cdot}$  la especie más reactiva de oxígeno, a través de la reacción de Fenton (Figura II, reacción 1) en donde el catión en su estado reducido ( $Fe^{2+}$ ), funciona como donador de un electrón en un proceso llamado “Ciclo de Haber-Weiss” (Figura II), en el cual la especie metálica es regenerada, cumpliendo así la función de catalizador (Kehrer, 2000).

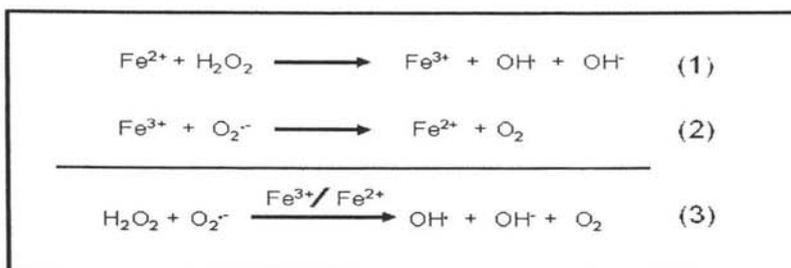


Figura II. Esquema del ciclo de Haber-Weiss (Kehrer, 2000).

El OH<sup>•</sup> reacciona con cualquier molécula con la que entre en contacto; sin embargo, un factor limitante en su acción es su incapacidad para difundir debido a su alta reactividad (Fridovich, 1998) y su corto tiempo de vida media, 1 nanosegundo (Weiss, 1986; Kehrer, 2000).

Como ya hemos visto las ERO son producidas constantemente en el organismo, algunas de ellas llevan a cabo funciones fisiológicas de gran importancia, pero también pueden provocar daños a la viabilidad celular dependiendo de su concentración, veamos ahora algunos ejemplos de ello.

## 2.2 Dualidad fisiológica de las ERO.

Las ERO intervienen en diversas vías intracelulares, por ejemplo el radical óxido nítrico (NO) producido a partir de la L-arginina por acción de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), en el endotelio vascular, lleva a cabo la relajación del músculo liso, su producción y uso también se da en macrófagos y granulocitos (Stuehr, 1990; Marletta, 1989), otro proceso en el que están involucradas las ERO es la respuesta del sistema inmune, ya que durante los procesos inflamatorios los neutrófilos y macrófagos liberan radicales libres (Victor *et al.*, 2004). El sistema NADPH-oxidasa localizado en los fagocitos genera O<sub>2</sub><sup>•-</sup> que sirve como señal inicial en la producción de otras especies oxidantes como son los óxidos de halógenos, los radicales libres y el oxígeno singulete, que son usados para aniquilar a los microorganismos invasores, con la desventaja de ocasionar el mismo efecto a las células aledañas del hospedero (Babior, 1999).

---

Las ERO pueden o no ser radicales libres, sin embargo se comportan como tales y con esto nos referimos a especie que contiene un electrón no apareado lo que les confiere una alta reactividad, ya que tiende a extraer electrones de otras especies ricas en ellos como las macromoléculas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc) ocasionando disturbios en su rearrreglo molecular (Fessenden & Fessenden, 1983), trayendo como consecuencia severos daños a la homeostasis del organismo.

## ***2.3 Daño oxidativo en macromoléculas.***

### ***2.3.1 Efecto sobre los lípidos.***

El contacto de los lípidos de la membrana con un agente oxidante, como las ERO, genera lipoperoxidación (Matés, 2000) reacción que comienza con la oxidación de una cadena insaturada del triglicérido dando la formación de un lípido hidroperóxido y un radical alquilo, éste último reacciona con una molécula de oxígeno y genera la especie inicial, constituyendo una reacción cíclica. Esta lipoperoxidación trae como consecuencia una alteración en la estructura de la membrana, afectando su fluidez y provocando daño en su integridad (Weiss, 1986). La peroxidación de los lípidos genera especies como el malonildialdehído y el 4-hidroxi-3-nonenal, los cuales son considerados como citotóxicos, ya que pueden funcionar como agentes electrofilicos que pueden interactuar con otros componentes celulares, principalmente proteínas (Stadtman & Levine, 2000) y ADN (Nair *et al.*, 1999). La lipoperoxidación es un proceso involucrado en enfermedades cardiovasculares, particularmente en la aterogénesis, el fundamento de dicha aseveración involucra el efecto de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Salvayre *et al.*, 2002).

### ***2.3.2 Efecto sobre las proteínas.***

Los efectos de los radicales libres sobre la proteína son: la oxidación de aminoácidos y el rompimiento del enlace peptídico, lo que origina la agregación entre proteínas, la pérdida de la actividad catalítica de enzimas, daño en la integridad de proteínas estructurales y la interrupción en la regulación de las vías metabólicas (Feinendegen, 2002; Mittler, 2002), en el caso de las proteínas es importante considerar a la reacción de Fenton, pues en presencia de concentraciones fisiológicas de  $Fe^{2+}$ , un aumento de  $H_2O_2$ , favorece la oxidación en los sitios de las proteínas involucrados en la unión a metales (Farber & Levine, 1986).

---

Los sistemas de reparación de las proteínas sólo se limitan a los residuos de metionina (Stadtman, 2004), de modo que las proteínas oxidadas tienen que ser hidrolizadas para evitar una disfunción en la red metabólica o para evitar interacciones inespecíficas con otras proteínas.

Una amplia variedad de enfermedades han sido directamente vinculadas con la presencia de las proteínas oxidadas, algunas de esas son: la enfermedad de Alzheimer, la artritis reumatoide y la cataratogénesis (Feinendegen, 2002).

### **2.3.3 Efecto sobre los ácidos nucleicos.**

Los radicales libres dañan al ADN al reaccionar con las bases nitrogenadas y con la desoxirribosa. El daño oxidativo al ADN es de extrema importancia, debido a que las bases nitrogenadas dañadas pueden generar mutaciones que resultan en carcinogénesis, apoptosis, necrosis y aún enfermedades hereditarias (Kehrer, 2000), también se ha observado que en presencia de las ERO se da la fragmentación del ADN (Higuchi, 2003).

Existen mecanismos de reparación del ADN, que se activan en el momento en que éste sufre modificaciones oxidativas. Cuando las ERO alcanzan al núcleo o se generan dentro de éste por reacciones de Fenton, existen mecanismos de reparación que funcionan de manera eficiente, y que continuamente monitorean y reparan el daño causado. Se ha reportado que el mecanismo de reparación por escisión de bases es el más importante en el caso de la modificación oxidativa (Slupphaug *et al.*, 2003), dicho mecanismo se caracteriza por la remoción de la base modificada por una enzima glucosilasa, dejando un sitio sin base (sitio AP), el cual es removido por una endonucleasa y el segmento es reemplazado por la acción de la ADN polimerasa I y la ligasa. Cuando la modificación afecta regiones más extensas del ADN, el sistema de reparación por escisión de nucleótidos es el que actúa, removiendo todo el segmento dañado a través de una nucleasa, para ser reemplazado por la ADN polimerasa I y una ligasa (Alberts *et al.*, 2001).

El daño oxidativo de las macromoléculas implica la existencia de mecanismos que ayuden a controlar los niveles de las ERO, de tal modo que no se permita una producción excesiva de éstas dentro de la célula, así como también, sistemas eficientes de reparación ante daños ocasionados por radicales libres de oxígeno. La viabilidad de la célula en condiciones donde abunda el oxígeno depende de un balance entre las condiciones oxidantes del ambiente y la función de sus sistemas antioxidantes (Urso & Clarkson, 2003).

## 2.4 Defensa antioxidante en la célula.

Las células cuentan con una variedad de sistemas antioxidantes, entre estos están las proteínas chaperonas o HSP (del inglés Heat Shock Protein), que generalmente se asocian con la termoprotección al mantener la estructura de las proteínas, pero también pueden actuar en la protección de la célula ante condiciones oxidantes, su modo de acción es hacer menos accesibles los sitios más susceptibles a la oxidación, otra forma es estabilizando la estructura parcialmente plegada debido al daño por la oxidación lo que favorece el proceso de reparación y re-plegamiento, si el daño hacia la estructura proteica es irreversible, las HSP cubren a la cadena polipeptídica para evitar la agregación con otras proteínas y promueven su hidrólisis (Papp *et al.*, 2003). Otro sistema antioxidante es la ferritina o la transferrina cuya acción es secuestrar al  $\text{Fe}^{2+}$  cuando se encuentra en exceso, evitando así la producción del radical hidroxilo, vía ciclo de Haber-Weiss, donde el  $\text{Fe}^{2+}$  participa como catalizador (Andrews, 2000), además el organismo cuenta con enzimas especializadas que se encargan de la detoxificación directa de las ERO, tales como la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPX) (Matés, 2000), las cuales protegen a la célula contra los efectos tóxicos de las ERO (Figura V).

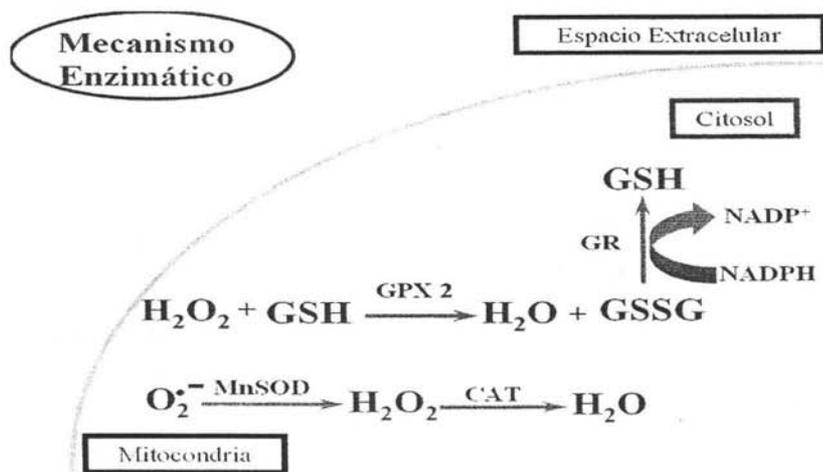


Figura V. Esquema de la detoxificación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el  $\text{O}_2^-$ , por acción enzimática en la célula (Apel & Hirt, 2004) GSH: glutatión en su forma reducida, GSSG: glutatión en su forma oxidada, MnSOD: superóxido dismutasa dependiente de manganeso.

## 2.4.1 Enzimas antioxidantes.

### 2.4.1.1 Superóxido dismutasa (SOD).

Las SOD son metaloenzimas que catalizan la conversión del  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  y  $O_2$  (Figura VI). Fue descrita por vez primera por McCord & Fridovich (1969).

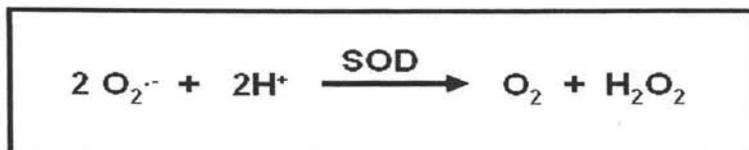


Figura VI. Detoxificación del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), por acción de la superóxido dismutasa.

En las células eucariotas existen tres isoformas de SOD. Todas son producto de genes nucleares diferentes y se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos (Ho *et al.*, 1991). Dos de estas isoformas contienen en su sitio activo Cu y Zn, y la otra contiene Mn. En la tabla I (Forsberg *et al.*, 2001) se mencionan los efectos que provocan al organismo la ausencia de la secuencia de genes que codifican para las isoformas de SOD.

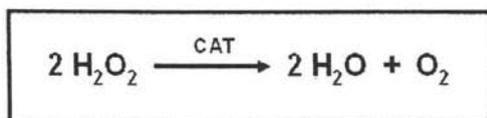
TABLA I. ISOFORMAS REPORTADAS DE LA SOD			
ISOFORMAS	UBICACIÓN		RATONES KNOCK-OUT
Cu/ZnSOD (SOD 1)	Citosol	Hígado, eritrocitos, cerebro y neuronas.	Fertilidad reducida en hembras
MnSOD (SOD 2)	Mitocondria	Corazón, cerebro, hígado y riñones.	Muerte en minutos después del nacimiento, las sobrevivientes sufren daño neurodegenerativo.
Cu/ZnSOD (SOD 3)	Extracelular	Plasma, líquido sinovial y linfa.	Hipersensibilidad a hiperoxia.

---

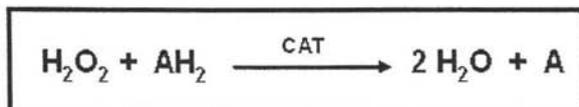
#### 2.4.1.2 Catalasa (CAT).

La CAT es una hemoproteína tetramérica con un peso de 240 kDa, con 4 ferriprotoporfirinas por molécula (Aebi, 1984) y su vida media en la circulación es relativamente corta, de 6-8 minutos (Price *et al.*, 1962). Está presente en los peroxisomas y posee una doble función:

a) Acción catalítica: descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ .



b) Actividad de peroxidasa: Oxidación de donadores de protones como el metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles, con el consumo de 1 mol de peróxido (Aebi, 1984).



En tejidos de mamíferos la CAT está presente en altas concentraciones en hígado y riñón, y en bajos niveles en tejido conectivo (Nakashima *et al.*, 1989); en general en las células se encuentra principalmente en los peroxisomas (80%) y mitocondrias, mientras que en eritrocitos existe en una forma soluble (Aebi, 1984).

#### 2.4.1.3 Glutación peroxidasa (GPX).

El  $\text{H}_2\text{O}_2$ , producto de la reacción de la SOD, es transformado en agua por una hidropoxidasa como la GPX, descrita por primera vez por Mills en 1957. Esta enzima contiene un átomo de selenio en su sitio activo y cataliza la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o de otros peróxidos orgánicos con la oxidación irremediable del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG), el cual es a su vez reducido a GSH por la glutatión reductasa (GR), en presencia de NADPH formando un ciclo redox e impidiendo que se agoten las reservas de GSH (Figura VII) (Harris, 1992; Ichikawa *et al.*, 1994).

El NADPH es regenerado a partir de  $\text{NADP}^+$ , por la acción de las enzimas málica, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

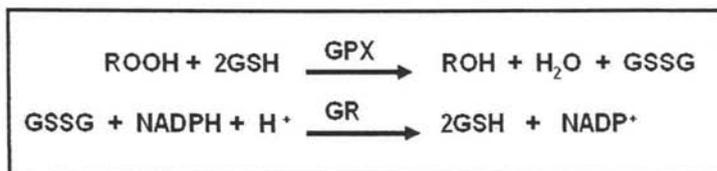


Figura VII. Reacciones catalizadas por la glutatión peroxidasa (GPX) y la glutatión reductasa (GR) (Apel & Hirt, 2004).

En la tabla II (Forsberg *et al.*, 2001) se menciona la ubicación de las isoformas y el principal papel protector.

ISOFORMAS	UBICACIÓN		PRINCIPAL PAPEL PROTECTOR.
GPX 1	ubicua	Eritrocitos, riñón, hígado.	-----
GPX 2	citosol	Tejido gastrointestinal.	Protección ante la ingesta de peroxilípidos.
GPX 3	extracelular	Plasma y placenta.	Reducción de hidroperóxidos

En contraste con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el  $\text{O}_2^-$ , no se conocen enzimas capaces de regular directamente las concentraciones de  $\text{OH}^-$ .

---

## 2.4.2 Mecanismos antioxidantes no enzimáticos.

El ascorbato y el glutatión (GSH) son las moléculas de mayor importancia en el sistema antioxidante no enzimático, así también participa el tocoferol, los flavonoides, alcaloides y carotenoides cuya función es neutralizar a las ERO.

### 2.4.2.1 Sistema antioxidante del glutatión.

El sistema antioxidante del glutatión juega un papel muy importante en la defensa de la célula contra las especies reactivas de oxígeno, al participar como agente reductor en la eliminación enzimática de especies tales como el  $H_2O_2$  y peróxidos orgánicos vía glutatión peroxidasa (GPX), además de mantener reducidos los grupos sulfhidrilo de las proteínas y el transporte de aminoácidos mediante el ciclo de la  $\gamma$ -glutamil y la detoxificación de compuestos externos por la glutatión-S-transferasa (GST) (Slivka *et al.*, 1987).

Dicho sistema antioxidante depende de la presencia del glutatión en su forma reducida (GSH) y de la funcionalidad de las enzimas responsables de su síntesis y regeneración de la  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetasa ( $\gamma$ -GCS) y la glutatión reductasa (GR), respectivamente (Meister, 1988).

### 2.4.2.2 Ciclo del ascorbato-glutatión.

La ascorbato peroxidasa (APX) es la enzima encargada de la detoxificación del  $H_2O_2$  mediante el uso del ascorbato como agente reductor, el monodehidroascorbato (MDHA) resultante es regenerado a ascorbato por acción de la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) en presencia de NADPH.

Se sabe que el MDHA puede presentar una conversión espontánea a dehidroascorbato (DHA) el cual también es reducido hasta ascorbato por acción de la dehidroascorbato reductasa (DHAR) usando como agente reductor al glutatión (GSH), finalmente el glutatión oxidado (GSSG) es regenerado por acción de la glutatión reductasa (GR) en presencia de NADPH (Apel & Hirt, 2004) (Figura VIII).

Mecanismos  
no enzimáticos

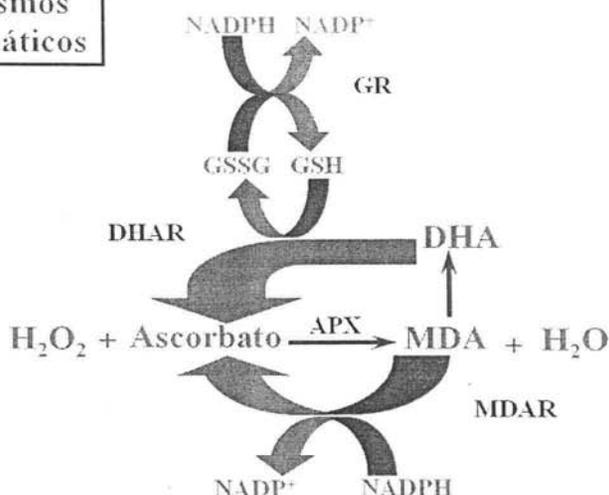


Figura VIII. Ciclo oxido-reducción del ascorbato y glutatión en la detoxificación del  $H_2O_2$  (Apel & Hirt, 2004). GR: glutatión reductasa, GSH: glutatión en su forma reducida, GSSG: glutatión en su forma oxidada, DHAR: dehidroascorbato reductasa, DHA: dehidroascorbato, APX: ascorbato peroxidasa, MDHA: monodehidroascorbato, MDHAR: monodehidroascorbato reductasa.

### 2.5 El estrés oxidativo y enfermedades relacionadas.

Por diversas causas, puede perderse el balance entre los factores oxidantes y las defensas antioxidantes, ya sea por el aumento de los niveles de ERO o bien, por la disminución de los sistemas antioxidantes o de reparación (Beckman & Ames, 1998), a tal condición se le denomina estrés oxidativo, al cual se han asociado, una amplia diversidad de estados patológicos como la enfermedad de Alzheimer, la artritis reumatoide, la cataratogénesis, la carcinogénesis y los daños causados por la isquemia-reperfusión y el proceso de envejecimiento (Stadtman & Berlett, 1997).

---

### 2.5.1 Causa - efecto

A continuación se mencionan algunas situaciones en las que el estrés oxidativo se ve favorecido y las disfunciones que puede ocasionar:

1) Diversos factores ambientales, como los contaminantes en el aire y la radiación ionizante puede favorecer el desbalance oxidante/antioxidante (Cross *et al.*, 2002).

2) Las macromoléculas biológicas al ser blancos de las ERO pueden sufrir daños debido al rompimiento o modificación de su estructura, trayendo como consecuencia una alteración en la función o incluso, la muerte de la célula (Feinendegen, 2002).

3) El desbalance entre la actividad y presencia de enzimas como la SOD, GPX y CAT trae como consecuencia la acumulación de  $H_2O_2$  el cual al participar en la reacción de Fenton origina el radical  $OH^{\cdot}$  (Haan *et al.*, 1995), la especie más reactiva del oxígeno.

4) El  $H_2O_2$  en elevadas concentraciones es capaz de afectar la unión del factor NF-KB de transcripción de esta manera, es posible afectar la transcripción de genes senescentes (Pereira-Smith & Smith, 1988).

5) El estrés oxidativo y la deficiencia de grupos tiol puede ser importante en el desarrollo de inmuno deficiencias (Staal *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 1993; Aukrust *et al.*, 1995).

Como ya hemos visto el estrés oxidativo es una condición que se debe evitar, pero no siempre los antioxidantes endógenos tanto enzimáticos como no enzimáticos son suficientes ante la acción de las ERO, producidas constantemente en el organismo, por ello se ha propuesto la suplementación con antioxidantes exógenos como son la vitamina C, la vitamina E, beta-carotenos, etc (Diplok & Charleux, 1998), presentes en extractos de plantas.

---

## ***2.6 Allium sativum L***

El ajo (*Allium sativum* L.) es cultivado en gran parte del mundo y sus propiedades medicinales han sido reconocidas en muchas culturas por sus efectos terapéuticos desde hace ya miles de años, al ser considerado como un agente antioxidante se ha sugerido que puede participar en la prevención de afecciones relacionadas con el estrés oxidativo (Rahman, 2003; Block, 1985; Lawson, 1998; Song & Milner, 1999; Banerjee & Maulik, 2002; Banerjee *et al.*, 2003b; Agarwal, 1996; Pedraza-Chaverri *et al.*, 1998; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2000b; Dillon *et al.*, 2002).

### ***2.7 Propiedades medicinales del ajo.***

#### ***2.7.1 El ajo y las enfermedades cardiovasculares.***

Estudios epidemiológicos han identificado un sin número de factores de riesgo involucrados en el desarrollo de la aterosclerosis entre los cuales se incluyen los niveles elevados de lípidos en suero (colesterol y triglicéridos), incremento de factores de coagulación y fibrinógeno en plasma, incremento en la actividad plaquetaria y alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Wood, 2001). La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es considerado como un mecanismo importante en el desarrollo de la aterosclerosis (Keaney, 2000).

El ajo ha sido usado en el tratamiento de problemas cardiovasculares por muchos años. Una de las propiedades bioquímicas más importantes del ajo es su potencial antioxidante, dicha acción antioxidante consiste en su capacidad para atrapar ERO, inhibir la lipoperoxidación y la oxidación de LDL, así como su efecto estimulante sobre los sistemas antioxidantes endógenos (Rahman, 2003).

#### ***2.7.2 El ajo y el cáncer.***

La carcinogénesis es un complicado proceso de múltiples etapas; la primera etapa inicia con la generación de una pequeña población de células anormales, la cual se incrementa como resultado de una serie de mutaciones y cambios en la expresión de los genes. Entre los factores que predisponen el inicio de dicho proceso se incluyen los factores ambientales, la dieta, los factores inherentes a cada individuo; además el riesgo de cáncer se incrementa con la edad (Ames & Shigenaga, 1992).

---

Está bien establecido que las ERO oxidan al ADN lo que puede llevar a mutaciones de genes cruciales que pueden originar cáncer (Ames & Shigenaga, 1992). Los potentes antioxidantes derivados de frutas y vegetales pueden ser capaces de aminorar los daños al ADN por oxidación disminuyendo así los riesgos de cáncer (Block, 1991).

Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de ajo está relacionado con la baja incidencia de desarrollo de cáncer (Bianchini & Vainio, 2001), ya que estudios recientes han demostrado que los componentes presentes en los extractos de ajo crudo pueden inhibir la proliferación de células cancerígenas de próstata, mama, colon, pulmón y piel (Pinto & Rivlin, 2001), además de inducir apoptosis de células tumorales de colon (Sundaram & Milner, 1996a; Sundaram & Milner, 1996b). Así el ajo, debido a su capacidad de atrapar ERO y por la acción estimulante en la actividad de SOD, CAT, y GPX, se ha convertido en un potente antioxidante, por lo que puede prevenir o reducir la incidencia de cáncer (Wei & Lau, 1998; Smith et al., 1999).

### ***2.7.3 El ajo y la función cerebral, en el envejecimiento.***

La disminución de la memoria y las funciones motoras son dos parámetros del comportamiento que pueden ser alterados tanto en humanos como en animales durante el envejecimiento.

El papel del estrés oxidativo es muy significativo en el cerebro, debido a que en él se consume el 20% del oxígeno inhalado, las concentraciones de compuestos y enzimas antioxidantes son relativamente pobres, además de la abundancia de ácidos grasos poliinsaturados, principales blancos de las ERO (Demopoulos *et al.*, 1982).

Los bajos niveles, en cuanto a defensa antioxidante se refiere, no son suficientes para detener las reacciones en cadena que inician los radicales libres, por ejemplo las reacciones de Maillard (entrecruzamiento entre proteínas y/o lípidos), ocasionan severos disturbios en la estructura y función de la célula (Kristal & Yu, 1992). Existen evidencias que sugieren que los procesos oxidativos conducen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson (Markesbery & Carney, 1999; Yves, 2000; Sukhjit & Gurcharan, 2002).

El papel del ajo en la prevención del envejecimiento cerebral tiene sustento en estudios que indican que las propiedades antioxidantes del ajo pueden mejorar la disfunción neurológica (Youdim & Joseph, 2001; Deschamps *et al.*, 2001).

Hasta ahora se ha dicho que el ajo es un potente antioxidante y debido a esta característica puede participar en la prevención de afecciones relacionadas con el estrés oxidativo, pero que es un antioxidante, se dice de la sustancia que a pesar de encontrarse en bajas concentraciones con respecto a los sustratos oxidables, entiéndase como cualquier molécula presente *in vivo* es capaz de reducir, evitar o prevenir la oxidación de los sustratos (Halliwell, 1990), así mismo un agente antioxidante es capaz de capturar, prevenir su formación y/o reparar el daño causado por las ERO (Aruoma *et al.*, 1997).

Para entender las propiedades antioxidantes del ajo es necesario conocer su composición bromatológica, enfocándose en los compuestos organosulfurados y las características de la alinasa.

## 2.8 Propiedades antioxidantes del ajo.

### 2.8.1 La composición del ajo y los compuestos organosulfurados.

La composición general del ajo se muestra en la tabla III, y como se puede observar está constituido principalmente de agua, carbohidratos, compuestos organosulfurados, proteínas, fibra y aminoácidos libres (Lawson 1996\*). Los minerales y vitaminas contenidos en el ajo son el Zn, Fe, Mg, Se, Mn, Na, Ca, la vitamina A, la C y las del complejo B.

Componente	% peso húmedo	Componente	% peso húmedo
Agua	62-68	Total de compuestos sulfurados	1.1-3.5
Carbohidratos (Fructanos)	26-30	Azufre	0.23-0.37
Proteínas	1.5-2.1	Nitrógeno	0.6-1.3
Aminoácidos	1-1.5	Minerales	0.7
Aminoácidos con azufre	0.6-1.9	Vitaminas	0.015
$\gamma$ -glutamilcisteínas	0.5-1.6	Saponinas	0.04-0.11
Lípidos	0.1-0.2	Total compuestos liposolubles	0.15 (entero) 0.7 (triturado)
Fibra	1.5	Total compuestos hidrosolubles	97



---

Ahora revisaremos solo algunos ejemplos de estudios que ponen de manifiesto la capacidad antioxidante del ajo.

### 2.8.2 Extracto de ajo crudo.

Cuando se utiliza el termino crudo nos referimos a que la alinasa se encuentra en su forma activa, por lo que en esta preparación la alicina (derivado de la alina por acción de la alinasa) será el componente mayoritario con actividad biológica y responsable del característico olor del ajo (Koch & Lawson, 1994), además junto con está se encuentran otros compuestos organosulfurados (Figura XI) como el alil-metil-tiosulfinato, el 1-propenil-alil-tiosulfinato y las  $\gamma$ -glutamilsteina (Lawson, 1994) que conservan su estructura al no ser sustrato de la alinasa.

Estudios recientes han demostrado que el extracto de ajo tiene un papel protector contra el daño renal inducido por el tetracloruro de carbono en ratas al administrar dosis de 100-500 mg/kg de peso corporal (Kagawa *et al.*, 1986) y que además previene la formación de malondialdehído (MDA), un producto de la lipoperoxidación inducida por el radical hidroxilo, en homogenados de hígado de conejo de manera dosis-dependiente (Prasad *et al.*, 1996), la ingesta de ajo también disminuye la lipoperoxidación y previene la disminución de la actividad de la GPX, en eritrocitos de rata tratados con adriamicina (Thabrew *et al.*, 2000). Además la administración crónica de extracto de ajo crudo protege al corazón contra el daño oxidativo inducido por isquemia-reperfusión (Mukherjee *et al.*, 2002). Otros estudios han reportado una capacidad antioxidante para el extracto de ajo a una concentración de 1 mg/ml tan efectiva como 30 nmol de vitamina C o bien una capacidad comparable con 3.6 nmol de alfa-tocoferol (Popov *et al.*, 1992) y que el extracto de ajo crudo es capaz de atrapar al OH<sup>•</sup> (Prasad *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001) y al O<sub>2</sub><sup>-•</sup> (Kim *et al.*, 2001).

En general todas las publicaciones que refieren a la evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de ajo crudo tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* han sido congruentes reconociendo ha dicho extracto como un excelente antioxidante (Lau, 2001; Banerjee *et al.*, 2002a; Avila, 2004; Prasad *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2000a; Sener *et al.*, 2003; Rietz *et al.*, 1993; Thabrew *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2002b; Banerjee *et al.*, 2003a; Mukherjee *et al.*, 2002).

---

Los métodos de preparación del ajo pueden influir en sus propiedades medicinales (Banerjee & Maulik, 2002; Banerjee *et al.*, 2003b; Dillon *et al.*, 2002; Rahman, 2003; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2000a; Sener *et al.*, 2003; Rietz *et al.*, 1993; Thabrew *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2002b; Banerjee *et al.*, 2003a; Mukherjee *et al.*, 2002), debido a que las condiciones del proceso comprometen la actividad de la alinasa, debido a este hecho, surgió el interés de evaluar la capacidad antioxidante de extractos de ajo donde la alinasa fuese inactivada, los siguientes párrafos describen algunos de los resultados obtenidos de dicha investigación.

## ***2.9 Inhibición de la alinasa y sus consecuencias.***

La alinasa (EC 4.4.1.4) es una glicoproteína responsable como ya se dijo de la conversión de la alina en alicina, su activación se produce cuando los dientes de ajo son triturados (Jansen *et al.*, 1989), al igual que otras enzimas es termolábil por lo que puede ser inactivada por (1) Calentamiento a temperatura de ebullición por 15 min. (2) Calentamiento en horno microondas a una potencia de 650W por 15-30 seg. o bien (3) al someterla a condiciones de pH menores a 4.5 (Song & Milner, 1999).

La consecuencia que trae esta inactivación es el bloqueo de la cascada de formación de la alicina y sus derivados a partir de la alina, lo que deriva en una serie de eventos sobre la actividad antioxidante del ajo crudo que aún no han sido por completo esclarecidos.

### ***2.9.1 La alina***

La alina, componente mayoritario en el ajo entero ha sido sintetizada y sometida a procesos oxidativos con la finalidad de dilucidar su actividad antioxidante; los resultados obtenidos revelan que así como la alicina presenta buena actividad antioxidante, también la alina pero en mayor grado. Dicha aseveración se sustenta en el hecho de que la actividad de la alina decrece después de ponerse en contacto con la alinasa, lo que sugiere que la alicina presenta una actividad antioxidante menor a la alina (Naito *et al.*, 1981). Otros estudios avalan la capacidad antioxidante de la alina al reportarla como un buen atrapador de radical hidroxilo (Kourounakis & Rekká, 1991). En 1995 Sheela & Augusti encontraron que la alina (99% pureza) incrementa los niveles de glutatión y la actividad de SOD y CAT, en ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol después de administrarles una dosis de 200 mg/kg de peso corporal durante dos meses.

---

Los estudios mencionados sustentan la actividad antioxidante de la alina, pero existe un reporte que contradice su buena actividad antioxidante al reportar a la alina como un débil atrapador de radical hidroxilo en el sistema del ácido linoleico (Hirata & Matsushima, 1996), por tal motivo los efectos antioxidantes atribuidos a la alina pura aún no se han establecidos con certeza.

### **2.9.2 Extracto de ajo hervido.**

La enzima alinasa responsable de convertir la alina en alicina es inactivada por calentamiento, debido a ello la alina es el compuesto organosulfurado presente en mayor proporción en el extracto de ajo hervido o en cualquier otro extracto donde la alinasa fuese inactiva (Figura XI).

Existe un reporte en el que se dice que la capacidad del extracto de ajo crudo para neutralizar al radical hidroxilo disminuye significativamente al someter a un proceso de calentamiento al ajo entero (Prasad *et al.*, 1996).

### **2.9.3 Extracto de ajo microhorneado.**

El extracto de ajo microhorneado es otro ejemplo de procesamiento en donde la alinasa ha sido inactivada, respecto a su capacidad antioxidante se sabe que al calentar dientes de ajo enteros durante 60 seg en el microondas se reducen sus propiedades anticancerígenas, pero cuando el calentamiento es aplicado 10 min después de triturar el diente de ajo, las propiedades anticancerígenas son preservadas indicando que la activación de la alinasa es necesaria para generar los compuestos responsables de la actividad anticancerígena y que además son estables al calentamiento (Song & Milner, 2001).

Por otra parte estudios hechos en nuestro laboratorio reportan que la inhibición de la alinasa ya sea por alguno de los siguientes tratamientos, preparación de dientes de ajo en escabache, por calentar a temperatura de ebullición o por microhornear dientes de ajo enteros no se afecta su capacidad para inhibir la oxidación de las lipoproteínas en suero humano (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2004b) y que al calentar dientes de ajo a temperatura de ebullición por 30 min. no disminuye su capacidad para atrapar  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  y  $H_2O_2$  (Avila, 2004).

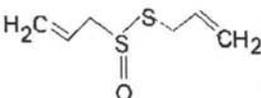
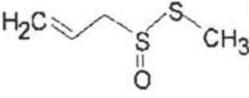
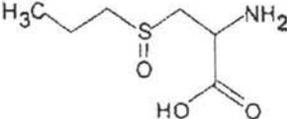
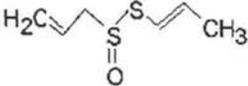
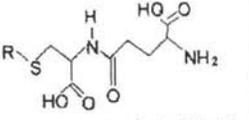
DIENTE DE AJO CRUDO		
AJO TRITURADO		AJO CALENTADO
 <p>Alicina</p>	 <p>metil-alil-tiosulfinato</p>	 <p>Alina</p>
 <p>1-propenil alil tiosulfinato</p>	 <p><math>\gamma</math>-glutamylcisteina</p>	

Figura XI. Compuestos de mayor concentración presentes en diferentes preparaciones de ajo (Banerjee *et al.*, 2003b).

---

### 3. JUSTIFICACIÓN.

Todas las publicaciones que refieren a la evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de ajo crudo tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* reconocen ha dicho extracto como un excelente antioxidante ya que es capaz de inhibir la lipoperoxidación, de atrapar  $H_2O_2$  y de inhibir la producción de  $OH\cdot$ , además de su acción preventiva en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Pedraza-Chaverrí et al., 2000a; Sener *et al.*, 2003; Rietz *et al.*, 1993; Thabrew *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2002b; Banerjee *et al.*, 2003a; Mukherjee *et al.*, 2002).

Se ha reportado que la capacidad del ajo para inhibir la producción del  $OH\cdot$  disminuye significativamente al hervirlo (Prasad *et al.*, 1996) y que también se reducen sus efectos anticancerígenos cuando es calentado durante 60 segundos en el microondas (Song & Milner, 2001). Sin embargo estudios hechos en nuestro laboratorio indican que cuando la alinasa es inactivada, ya sea por alguno de los siguientes tratamientos: preparación de dientes de ajo en escabache, hervidos o microhorneados no se afecta su capacidad para inhibir la oxidación de las lipoproteínas en suero humano (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2004b) y que al hervir los dientes de ajo por 30 min. no disminuye su capacidad para atrapar  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH\cdot$  y  $H_2O_2$  (Avila, 2004).

Esta controversia sobre la disminución o mantenimiento de la capacidad antioxidante de los extractos de ajo donde la alinasa ha sido inhibida origina el presente trabajo, que pretende ser un sustento que sirva para establecer con certeza la participación de la actividad de la alinasa en la conservación de las propiedades antioxidantes del ajo.

---

#### 4. HIPÓTESIS.

Si la actividad de la alinasa determina la capacidad antioxidante del ajo entonces su inactivación tendrá un efecto negativo en dicha capacidad.

#### 5. OBJETIVOS.

- ❖ Determinar la cantidad de extracto de ajo crudo, extracto de ajo en escabeche y extracto de ajo microhorneado necesaria para atrapar el 50% de la concentración inicial de  $O_2^-$ ,  $OH^-$  y  $H_2O_2$ .
- ❖ Determinar el efecto en la capacidad antioxidante del ajo al inhibir a la alinasa.
- ❖ Determinar la eficacia del extracto de ajo crudo con respecto a compuestos reconocidos por su actividad antioxidante (piruvato, NDGA y DMTU).

---

## 6. METODOLOGÍA.

### 6.1 *Materiales y reactivos.*

#### 6.1.1 *Reactivos.*

El diente de ajo fresco y el vinagre se adquirieron en una tienda de autoservicio (México D.F.).

La xantina oxidasa, la xantina, el ácido ascórbico, el ácido tiobarbitúrico (TBA), la deferoxamina (DFO), la dimetiltioureia (DMTU), el piruvato, el tetrametoxipropano, la desoxirribosa, el nitroazul de tetrazolio (NBT), el naranja de xilenol y el hidroxitolueno butilado se adquirieron de Sigma Chemical Co. (San. Luis, MO, EUA).

El ácido tricloroacético (TCA), el ácido etilendiaminotetracético (EDTA), el carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), las sales de fosfato para los amortiguadores, el sulfato ferroso amoniacal hexa hidratado ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), el ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y el ácido clorhídrico (HCl) se adquirieron de J.T. Baker (México, D.F.).

El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el metanol grado HPLC se adquirieron de Mallinckrodt (México D.F.) y el cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) se adquirió de Aldrich (San Luis, MO, EUA). Todos los reactivos empleados fueron grado analítico.

### 6.2 *Preparación de los extractos de ajo.*

#### 6.2.1 *Extracto de ajo crudo (EAC).*

Considerando que el diente de ajo crudo tiene aproximadamente 70% de agua y 30% de compuestos sólidos, se preparó una solución stock de concentración 0.1 g de compuestos sólidos por mL de agua, por lo que se calculó la cantidad en gramos de sólidos y agua en cada diente de ajo a utilizar; a continuación se muestra un ejemplo:

El peso promedio de un diente de ajo sin pelar es de 3.458 g, si multiplicamos dicho valor por 0.7 y 0.3 (que corresponden a los porcentajes de las fracciones de agua y sólidos presentes en el ajo, respectivamente), obtenemos la cantidad en gramos de ambas fracciones. Así los sólidos corresponden a 1.037 g y el agua a 2.42 g.

---

El diente de ajo fue pelado y cortado finamente antes de homogeneizar; debido a que el peso de los sólidos corresponde a 1.037 g se adicionan 10.37 mL de agua para obtener una concentración de 0.1 g/mL, pero como el agua constitutiva del ajo es igual a 2.42 g y considerando que la densidad del agua es igual a 1 g/mL, se realiza la siguiente corrección:

10.37 mL de agua destilada – 2.42 mL de agua constitutiva = 7.95 mL de agua destilada que debe ser adicionada.

La homogenización se realizó con la ayuda de un politrón, la suspensión resultante fue sometida a centrifugación en un equipo Beckman, modelo J2-21 a 15,000 rpm por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se recuperó asumiendo una concentración de 0.1 g/mL.

A partir de la solución stock se hicieron las diluciones pertinentes a evaluar en cada uno de los tres sistemas de generación y/o detección de las ERO: xantina/xantina oxidasa para  $O_2^-$ , ensayo de FOX para  $H_2O_2$  y el sistema del  $Fe^{3+}$ -EDTA- $H_2O_2$ -desoxirribosa para el  $OH^{\cdot}$ , los cuales se detallarán más adelante.

### **6.2.2 Extracto de ajo en escabeche (EAEsc).**

Se eligió un diente de ajo visiblemente sano, sin ninguna daño aparente, esto fue para asegurar que la alinasa no entrara en contacto con su sustrato y se generen la alicina y sus derivados.

El diente de ajo fue pesado y colocado un vaso de precipitados que contenía una solución vinagre:agua (1:1), volumen que fue suficiente para cubrirlo (aprox. 140 mL), posteriormente se calentó hasta ebullición por un lapso de 30 minutos, debido al tratamiento la piel que cubre al diente de ajo se desprendió.

El ajo fue nuevamente pesado, después de haberse enfriado a temperatura ambiente, con lo que se determinó el valor en gramos del peso que ganó, debido al proceso.

El diente de ajo fue cortado y homogeneizado con la cantidad de agua necesaria para llegar a la concentración de 0.1 g/mL, los cálculos fueron los mismos que se describieron en la preparación del extracto de ajo crudo, con la diferencia de que al valor de agua constitutiva se le sumó el peso ganado en el proceso.

Se procedió a centrifugar en las mismas condiciones descritas para el ajo crudo y se recuperó el sobrenadante.

### 6.2.3 Extracto de ajo microhorneado (EAM).

Al igual que el EAEsc se cuidó que el diente de ajo a utilizar no presentara daños aparentes, después se pesó y sometió al tratamiento térmico por microondas durante 30 segundos a una potencia de 1100 W, debido al proceso parte del agua constitutiva del ajo se perdió al evaporarse, por lo que el peso del ajo después del calentamiento fue menor, por ello fue necesario pesarlo nuevamente.

Se siguió el mismo procedimiento en cuanto a cálculos y obtención del sobrenadante descrito para el EAC, con la diferencia de restar el valor debido a la pérdida de agua al valor correspondiente de agua constitutiva.

## 6.3 Preparación de los estándares atrapadores de ERO.

### 6.3.1 Piruvato.

El piruvato fue preparado en una concentración de 0.1 g/mL de agua, a partir de la cual se hicieron las diluciones necesarias para cada ensayo. La razón de que fuese utilizado como estándar fue debido a su reconocida capacidad de reducción al  $H_2O_2$  *in vitro* (Salahudeen *et al.*, 1991). En la Figura XII se muestra la reacción que lleva a cabo.



Figura XII. Descarboxilación del piruvato por el  $H_2O_2$ .

### 6.3.2 Ácido nordihidroguayarático (NDGA).

El NDGA (Figura XIII) fue utilizado como estándar, ya que muestra una gran capacidad para atrapar  $O_2^-$  (Kanehira *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 2002), se preparo en una concentración de 0.1 g/mL de agua, a partir de la cual se hicieron las diluciones necesarias para cada ensayo.

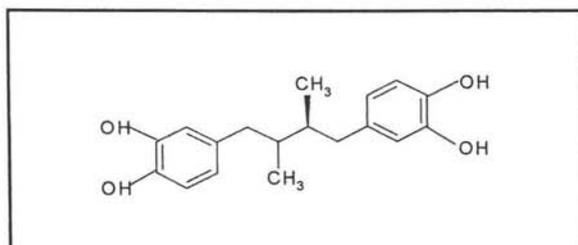


Figura XIII. Estructura química del NDGA.

### 6.3.3 Dimetil tiourea (DMTU).

La dimetil tiourea (Figura IX) fue elegida como estándar debido a su potente capacidad atrapadora de radical  $OH^\cdot$  (Walter & Shah, 1988), se preparo en una concentración de 0.1 g/mL de agua, a partir de la cual se hicieron las diluciones necesarias para cada ensayo.

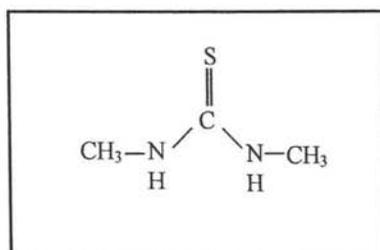


Figura IX. Dimetil tiourea

## 6.4 Valoración espectrofotométrica de la capacidad antioxidante.

6.4.1 Evaluación de la capacidad atrapadora de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por los extractos de ajo mediante el ensayo de  $Fe^{3+}$ -naranja de xilenol ( $Fe^{3+}$ -Orange Xylenol; FOX) (Lee & Halliwell 2001; Jiang *et al.*, 1992).

El ensayo de hierro-naranja de xilenol (FOX) se basa en la oxidación del ion ferroso ( $Fe^{2+}$ ) por el  $H_2O_2$  a la forma férrica ( $Fe^{3+}$ ) la cual se une al naranja de xilenol y forma un complejo colorido que absorbe a 560 nm (Figura XV).

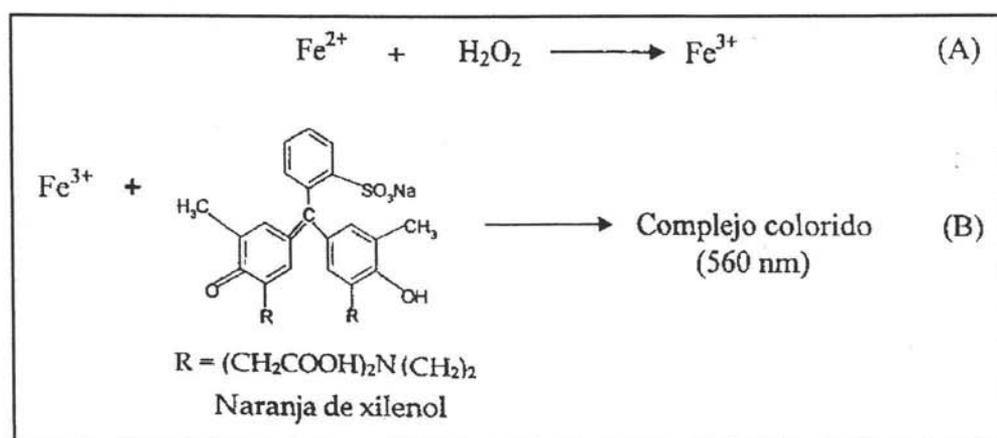


Figura XV. (A) Oxidación del ion ferroso por el  $H_2O_2$ . (B) Formación del complejo por el  $Fe^{3+}$  y el naranja de xilenol.

Para determinar la capacidad antioxidante de cada una de las muestras, fue necesario incubarlas en presencia de una concentración conocida de  $H_2O_2$  (se usó el estándar 50  $\mu M$ , para diluirlo 1:2 con las diferentes concentraciones de las muestras, por lo tanto la concentración inicial de  $H_2O_2$  en el ensayo será de 25  $\mu M$  en el caso del blanco (agua: $H_2O_2$  50  $\mu M$ ). Después de la incubación (60 segundos) se midió la cantidad de  $H_2O_2$  remanente, es decir, la cantidad de  $H_2O_2$  que la muestra (EAC, EAEsc, EAM y piruvato) no fue capaz de atrapar en cada uno de los tubos mediante el siguiente procedimiento:

Se prepararon estándares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabla IV) y el ensayo de FOX se hizo de la siguiente manera:

Estándar	Blanco	1	2	3	4	5	6
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ], μM	0	2.5	5	10	25	50	75

\* Los estándares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se prepararon a partir de una solución "stock" de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM.

En tubos Eppendorf se adicionaron las cantidades indicadas en la tabla V.

Reactivos	*Referencia	Muestra	Curva
MeOH	10 μl	10 μl	10 μl
Reactivo de FOX	900 μl	900 μl	900 μl
Estándar H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-----	-----	90 μl
Agua / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	90 μl	-----	-----
Muestra / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-----	90 μl	-----

\*el tubo referencia, es la concentración máxima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en el ensayo en ausencia de muestra (aproximadamente 25 μM).

Una vez terminada dicha operación se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos, tiempo suficiente para asegurar la formación del complejo entre el Fe<sup>3+</sup>-naranja de xilenol. Después se midió la absorbancia a 560 nm vs la curva estándar.

A partir de la curva estándar se determinó la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> remanente presente en cada uno de los tubos de las muestras. Los datos de absorbancia fueron convertidos en % tomando como 100% el dato de absorbancia del tubo referencia, la operación que se realizó fue multiplicar el valor de la absorbancia de cada una de las muestras por 100 y dividir entre el valor de absorbancia del tubo referencia. Una vez obtenido este dato, se calculó el % capacidad de atrapamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de cada una de las concentraciones de los tres extractos de ajo y el piruvato restando a 100 el valor obtenido anteriormente.

---

En el panel A, figuras XIV, XVI y VXIII se observan las graficas donde se representa la relación % capacidad de atrapamiento vs concentración (mg/mL) de los extractos de ajo y el estándar, en el eje de las abscisas los valores se muestran como logaritmo de la concentración, lo que nos permitió ilustrar en una escala más adecuada la capacidad de atrapamiento de las muestras, dicha estrategia fue necesaria debido a que los valores de concentración van de  $\mu\text{g/mL}$  a  $\text{mg/mL}$ .

Para comparar cuantitativamente la actividad atrapadora de las muestras frente a una concentración constante y conocida de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se determinó la  $\text{CI}_{50}$  definida como la cantidad de muestra necesaria para atrapar el 50% de la concentración presente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  *in vitro*.

Este valor se determinó mediante el método de mínimos cuadrados en el cual se grafica el log de la concentración vs el % capacidad de atrapamiento, la pendiente de la recta resultante es el valor de la  $\text{CI}_{50}$ . Se graficaron sólo los valores que permitían obtener un coeficiente de correlación  $\geq 0.8$ .

La preparación de soluciones se muestra en el Apéndice.

6.4.2 Capacidad atrapadora de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) por los extractos de ajo a partir del sistema xantina/xantina oxidasa (Murrant & Reid 2001; Bielski *et al.*, 1980; Owen & Johns 1999).

Este método se basa en la reacción que cataliza la xantina oxidasa, la cual consiste en la conversión de la xantina en ácido úrico, con la generación simultánea de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el cual reduce al NBT formándose el formazán (Figura XVI).

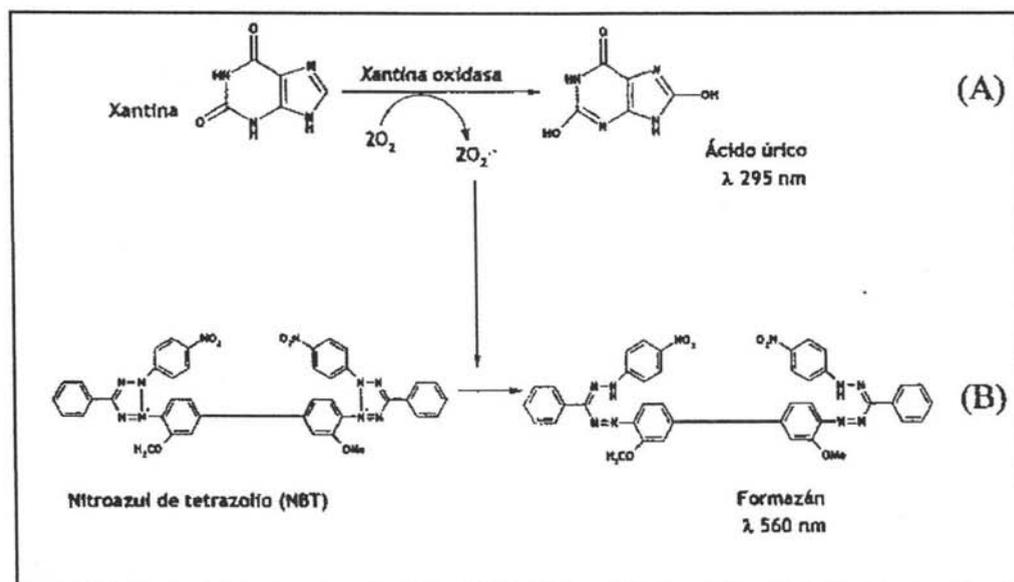


Figura XVI. (A) Generación del  $O_2^{\cdot-}$  y ácido úrico a partir del sistema xantina/xantina oxidasa. (B) Reducción del NBT por el  $O_2^{\cdot-}$ .

Debido a que el formazán es un compuesto colorido que presenta su máxima absorbancia a 560 nm se aprovecha esta característica para cuantificar indirectamente al  $O_2^{\cdot-}$  presente en una muestra.

Para probar que el NDGA y los extractos de ajo tienen actividad atrapadora sobre el  $O_2^{\cdot-}$  y no que eviten la formación de este inhibiendo a la xantina oxidasa, también fue necesario medir la densidad óptica a 295 nm que es la longitud de onda máxima a la que absorbe el ácido úrico.

A continuación se detalla el ensayo:

En un tubo de ensayo se adicionaron las cantidades indicadas en la tabla VI, en el orden indicado, ya que la reacción se inicia con la adición de la xantina oxidasa.

Mezcla de reacción	*Referencia	Muestra
Sustrato	800 $\mu$ L	800 $\mu$ L
Muestra	-----	100 $\mu$ L
Amortiguador de fosfatos 50 mM	100 $\mu$ L	-----
Xantina oxidasa (168 U/L)	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L

\*el tubo Referencia, es el valor de máxima producción de  $O_2^{\cdot-}$ , en las condiciones establecidas.

La composición del sustrato fue la siguiente:

	[Final]
Xantina	0.116 mM
Carbonato de sodio	0.02 M
NBT	29 $\mu$ M

\* Los compuestos se disolvieron en amortiguador de fosfatos 50 mM y pH 7.0.

Se usó un programa de longitud de onda fija, en donde se registraron simultáneamente los valores de absorbancia a 560 y 295 nm, cada minuto durante tres minutos.

Durante el ensayo fue muy importante que el delta de absorbancia por minuto a 560 nm fuese de aproximadamente 0.05, ya que esto nos aseguró que la producción de  $O_2^{\cdot-}$  era constante. En cada ensayo el volumen de xantina oxidasa que se añadió se ajusto hasta obtener el valor del delta mencionado (se usaron aproximadamente 40  $\mu$ L de la solución de xantina oxidasa).

Una vez obtenidas las absorbancias a 560 nm (formación de formazán) y 295 nm (producción de ácido úrico) tanto para el tubo referencia como para cada una de las concentraciones crecientes de muestra, se procedió a calcular el % de formazán, lo que es equivalente a el % de producción de  $O_2^{\cdot-}$  y el % de producción de ácido úrico.

Los datos de absorbancia a 560 nm de cada una de las muestras a las diferentes concentraciones fueron convertidos en % de producción de  $O_2^{\cdot-}$  tomando como 100% el valor de absorbancia a 560 nm del tubo referencia, la operación que se realizó fue multiplicar el valor de la absorbancia de cada una de las muestras por 100 y dividir entre el valor de absorbancia del tubo referencia. La misma operación se realizó para los datos de absorbancia a 295 nm.

Una vez conocido el % de producción de  $O_2^{\cdot -}$  y de ácido úrico el siguiente paso fue calcular el % capacidad de atrapamiento de  $O_2^{\cdot -}$  de cada una de las concentraciones crecientes de los tres extractos de ajo y del NDGA para determinar dicho valor se restó a 100 el % de producción de  $O_2^{\cdot -}$ , después se determino el valor de la  $CI_{50}$ , como se describió en el ensayo anterior.

La preparación de soluciones se muestra en el Apéndice.

**6.4.3 Evaluación de la capacidad atrapadora de radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) por los extractos de ajo a partir del sistema del  $Fe^{3+}$ -EDTA- $H_2O_2$ -desoxirribosa** (Halliwell & Gutteridge, 1992; Halliwell & Gutteridge, 1985; Halliwell *et al.*, 1987; Halliwell & Gutteridge, 1981).

Se usó un sistema generador de  $OH^{\cdot}$  para determinar la capacidad de atrapamiento de cada muestra para este radical. En el ensayo el  $OH^{\cdot}$  es generado a partir de la reacción de Fenton (Figura XVII; reacción 1), el cual degrada a la desoxirribosa a sustancias como el malondialdehído (reacción 2) que bajo calentamiento con ácido tiobarbitúrico (TBA) y a pH ácido, forman un cromógeno rosa (reacción 3) que fue medido espectrofotométricamente a 532 nm y cuantificado a partir de una curva de tetrametoxipropano. Cuando se agregan atrapadores del  $OH^{\cdot}$ , estos compiten con la desoxirribosa por los radicales producidos y entonces la formación del cromógeno disminuye. La fragmentación de la desoxirribosa para producir malondialdehído se inicia solamente por oxidantes fuertes como lo es el  $OH^{\cdot}$ , pero no por el  $O_2^{\cdot -}$  ni por  $H_2O_2$ .

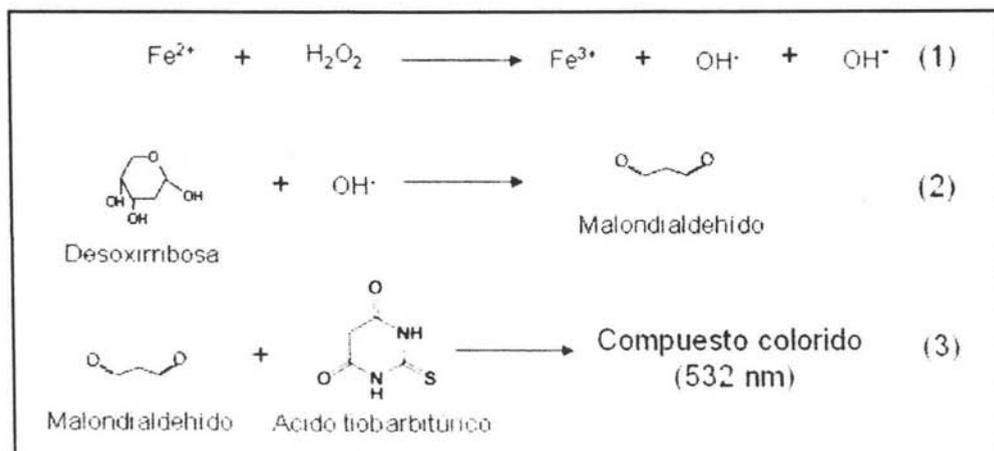


Figura XVII. Degradación de la desoxirribosa por el radical  $OH^{\cdot}$  generado por la reacción de Fenton y la posterior detección de las sustancias reactivas al TBA.

A continuación se describe el ensayo:

En un tubo de vidrio de 12 x 75 mm se adicionaron las cantidades indicadas en la tabla VI en el orden señalado, ya que la reacción se inicia con la generación de OH<sup>-</sup> por la reacción de Fenton, donde el EDTA y el FeCl<sub>3</sub> son indispensables.

[Reactivos] en el ensayo	Referencia (μL)	Muestra (μL)
Ac. Ascórbico 0.2 mM	200	200
Desoxirribosa 2.8 mM	200	200
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 mM	100	100
Amortiguador de K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM pH 7.4	300	300
Muestra	-----	100
Agua	100	-----
EDTA/FeCl <sub>3</sub> 0.208/0.2 mM	200	200

\*el tubo Referencia, es el valor de máxima producción de OH<sup>-</sup>, en las condiciones establecidas.

Después de haber terminado dicha operación se incubó durante 1 hora en un baño de agua a 37°C, 15 minutos antes de cumplirse la hora de incubación se preparó la curva estándar con tetrametoxipropano (TMPO) a una concentración de 74 μM (Tabla VII).

Estándar	Blanco	1	2	3	4	5	6
[malondialdehído], nmol	0	0.37	0.74	1.48	2.96	7.4	14.8

La detección de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA) se inicia con la adición de 1 mL de la solución de TBA/HCl/DFO al tubo referencia, curva y muestras, después de terminada la incubación a 37 °C, posteriormente se incubó por 10 minutos a una temperatura de 97°C en un baño de aceite; después se obtuvo la densidad óptica (D.O) a 532 nm vs la curva estándar de tetrametoxipropano. A partir de la curva estándar se determinó la cantidad de malondialdehído generado por la fragmentación de la desoxirribosa, medida indirecta del OH<sup>-</sup> libre, es decir, del que no fue capturado por los tres diferentes extractos de ajo y el estándar (DMTU) y que por lo tanto fue capaz de reaccionar con la desoxirribosa.

---

Se probaron concentraciones de los extractos de ajo en un rango de 0.1 a 4.6 mg/mL notando que a concentraciones mayores a 2.6 mg/mL la D.O. de los tubos era mayor que la D.O. del tubo de referencia. Este hecho lo adjudicamos a la presencia de los extractos de ajo ya que el DMTU a concentraciones mayores a 2.6 mg/mL no causó este efecto.

Los datos de absorbancia fueron convertidos en % de producción de OH<sup>-</sup> tomando como 100% de producción el dato de absorbancia del tubo referencia, la operación que se realizó fue multiplicar el valor de la absorbancia de cada una de las muestras por 100 y dividir entre el valor de absorbancia del tubo referencia. Una vez conocido el % de producción de OH<sup>-</sup> en presencia de las diferentes concentraciones de los tres extractos de ajo y del DMTU se restó a 100 dicho valor obteniendo el % de atrapamiento de OH<sup>-</sup>.

El % de atrapamiento de OH<sup>-</sup> correspondientes a los extractos de ajo en el mejor de los casos alcanzó un 50% por lo que no fue posible continuar con el cálculo de la CI<sub>50</sub> debido a la falta de datos para generar la recta ajustada, entonces la capacidad de atrapamiento se expresó como, el % máximo de atrapamiento.

La preparación de soluciones se muestra en el Apéndice.

---

## 6.5 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se hizo con el programa de estadística (Graph Pad Prism versión 3.02, San Diego, CA, EUA) aplicando un ANOVA paramétrico seguido por el método de Dunnett; en dicho análisis se comparó el % de producción de las ERO en presencia de concentraciones crecientes de muestra con el % de producción inicial en ausencia de muestra, considerando como diferencia significativa una  $p \leq 0.05$ . Los datos se expresan como promedio  $\pm$  error estándar (EE).

La comparación entre estos dos grupos nos permite asegurar que la disminución en el % de producción de ERO en presencia de concentraciones crecientes de muestra es significativa, es decir, que el EAC, el EAEsc, el EAM y los estándares cada uno por separado presentan actividad antioxidante.

Los valores de la  $CI_{50}$  para  $H_2O_2$ , el  $O_2^{\cdot -}$  y el % máximo de atrapamiento para el  $OH^{\cdot}$  obtenidos para el EAEsc y el EAM fueron comparados con respecto a los valores calculados para el EAC, y así a su vez el EAC fue comparado con los estándares, para dicho análisis se aplicó un ANOVA paramétrico seguido por comparaciones múltiples por el método de Bonferroni; se consideró como diferencia significativa una  $p \leq 0.05$ . Los datos se expresan como promedio  $\pm$  error estándar (EE).

El objetivo de comparar los valores de la  $CI_{50}$  de los tres extractos de ajo entre sí y con el estándar correspondiente, obtenidos para cada ERO, es el de establecer una diferencia significativa cuantificable entre la capacidad antioxidante de los extracto donde la alinasa ha sido inactivada con respecto a la actividad del extracto donde la alinasa continua activa, que finalmente es lo que nos permitió responder a la pregunta que dio origen al presente trabajo "*la capacidad antioxidante de los extractos de ajo, donde la alinasa ha sido inhibida, se mantiene o disminuye con respecto a la capacidad antioxidante del EAC*".

## 7. RESULTADOS.

### 7.1 Peróxido de hidrógeno.

El extracto de ajo crudo (EAC), el extracto de ajo en escabeche (EAEsc), el extracto de ajo microhorneado (EAM) y el piruvato fueron sometidos a un proceso oxidativo en el cual se evaluó su capacidad para atrapar el  $H_2O_2$ . El proceso oxidativo consistió en adicionar una cantidad constante de  $H_2O_2$  (valor de referencia), seguido de la cuantificación del  $H_2O_2$  remanente al adicionar cantidades crecientes (0.1- 4.6 mg/mL) de los tres diferentes extractos de ajo y del piruvato, obteniendo en todos los casos curvas concentración-respuesta dependiente (Figura XIII).

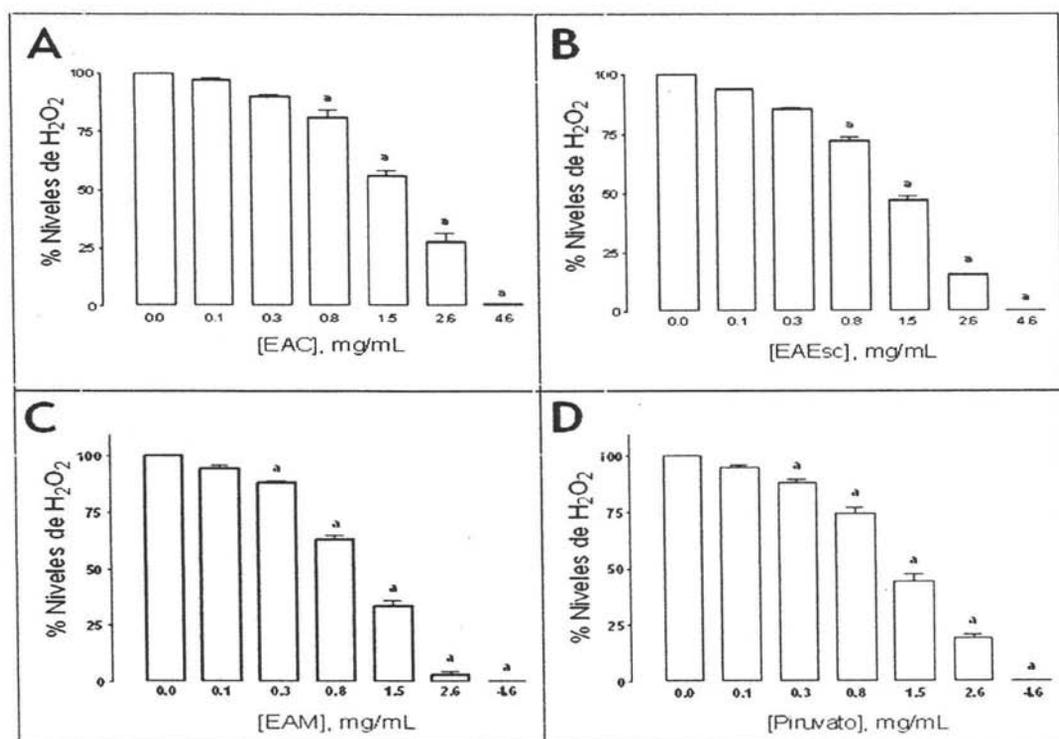


Figura XIII. Efecto de concentraciones crecientes de extracto de ajo crudo (A), extracto de ajo en escabeche (B), extracto de ajo microhorneado (C) y del piruvato (D) sobre los niveles de  $H_2O_2$ . Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE.  $n = 4$ .  $a = p < 0.001$  vs valor de referencia.

El EAC y el EAEsc mostraron una capacidad de atrapamiento significativa a partir de 0.8 mg/mL (Figura XIII, Panels A y B) mientras que el EAM y el piruvato lo hicieron a una concentración de 0.3 mg/mL (Figura XIII, Panels C y D). El valor de  $CI_{50}$  para el EAC (1.57 mg/mL) (Figura XIV, Panel B) fue similar al del EAEsc (1.27 mg/mL) lo que sugiere que la capacidad para atrapar  $H_2O_2$  es igual. En contraste, el valor de  $CI_{50}$  para el EAM (0.89 mg/mL) fue 1.7 veces más bajo que para el EAC indicando que el EAM es 43% más efectivo para atrapar  $H_2O_2$  que el EAC. El valor de  $CI_{50}$  para el piruvato (1.08 mg/mL) fue similar al del EAM mientras que para EAC y EAEsc fue 1.4 y 1.2 veces menor, respectivamente, lo que indica que el piruvato es 30 y 19% más eficaz para atrapar  $H_2O_2$  que el EAC y EAEsc.

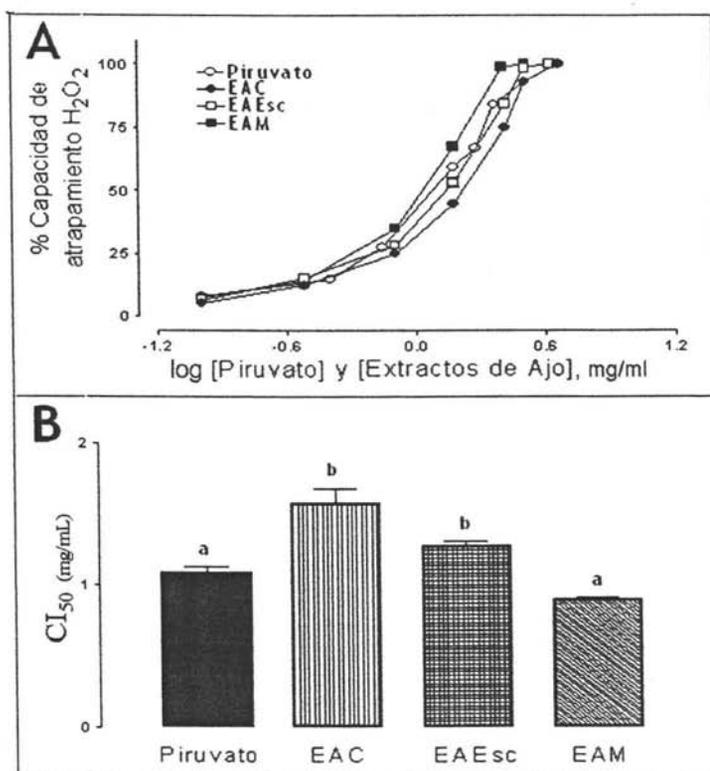


Figura XIV. El panel A muestra los porcentajes de atrapamiento de  $H_2O_2$  de los tres extractos y del piruvato. El panel B muestra los valores de la  $CI_{50}$  (mg/mL). Las letras diferentes indican diferencia significativa donde a =  $p < 0.001$  vs EAC. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE. n = 4.

## 7.2 Anión superóxido.

En la Figura XV se muestra el efecto de los extractos de ajo (Panels A, B y C) y del NDGA (Panel D) sobre la producción de  $O_2^{\cdot -}$  y el ácido úrico por el sistema xantina-xantina oxidasa descrito previamente (ver métodos). Los datos están expresados como % de producción de  $O_2^{\cdot -}$  y ácido úrico, barras blancas y negras, respectivamente, y fueron comparadas con el tubo referencia. La presencia de los extractos de ajo y NDGA disminuyen la producción de  $O_2^{\cdot -}$  en una relación dependiente de la concentración.

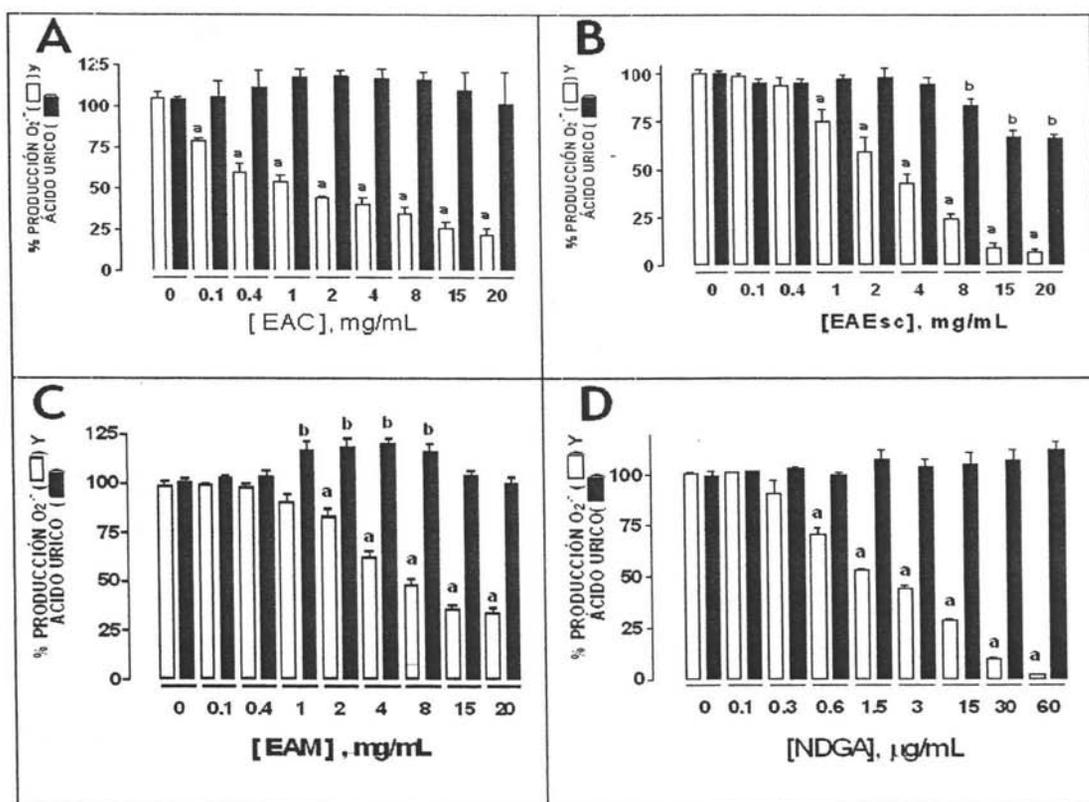


Figura XV. Efecto de concentraciones crecientes de extracto de ajo crudo (A), extracto de ajo en escabeche (B), extracto de ajo microhorneado (C) y del NDGA. (D) sobre la generación del anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) (□) y de ácido úrico (■) en el sistema xantina-xantina oxidasa. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE. n = 4. a =  $p < 0.001$ , b =  $p < 0.05$  vs valor de referencia.

El EAC, EAEsc y EAM (Figura XV; Panels A, B y C) disminuyeron significativamente la producción de  $O_2^-$  a partir de 0.1, 1 y 2 mg/mL, respectivamente y a 0.1  $\mu\text{g/mL}$  para el NDGA (Panel D). El EAC y el NDGA (Panels A y D) fueron incapaces de afectar la producción de ácido úrico indicando que la disminución de la producción de  $O_2^-$  fue debida a la acción del EAC y el NDGA y no un efecto secundario por la inhibición de la xantina oxidasa. En contraste, el EAEsc (Panel B) fue capaz de disminuir la producción de ácido úrico a las más altas concentraciones: 8, 15 y 20 mg/mL; sin embargo la disminución en la producción de  $O_2^-$  fue claramente más alta que la disminución de la producción de ácido úrico indicando que el EAEsc es verdaderamente capaz de atrapar al  $O_2^-$ .

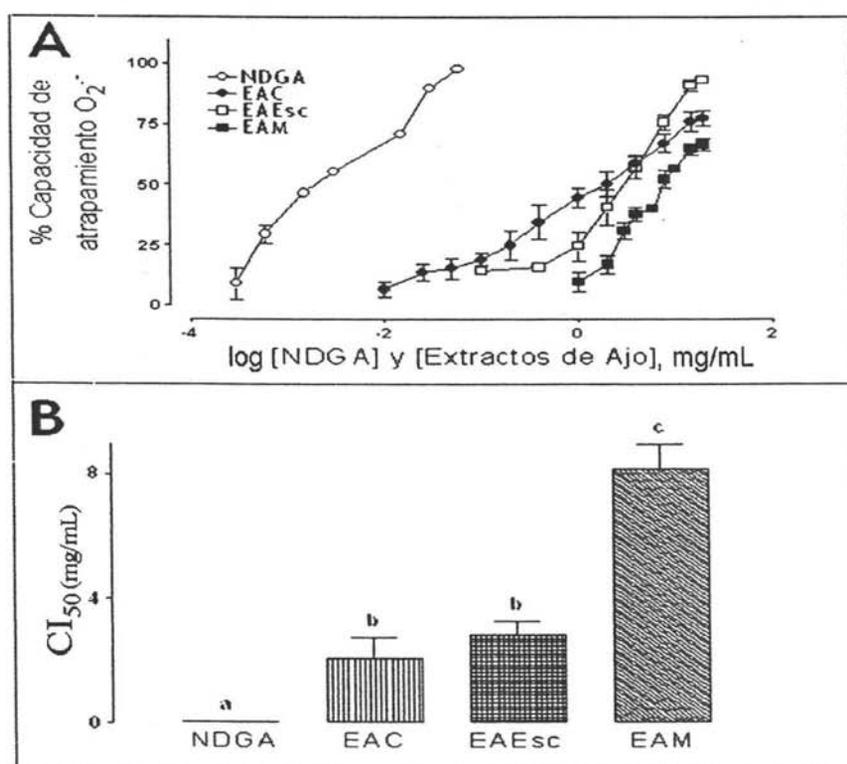


Figura XVI. El panel A muestra los porcentajes de atrapamiento de  $O_2^-$  de los tres extractos y del estándar. El panel B muestra los valores de la  $CI_{50}$  (mg/mL). Las barras con la misma letra no muestran diferencia significativa, a =  $p < 0.001$  vs b, c. c =  $p < 0.05$  vs b. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE. n = 4.

---

En la Figura XVI, Panel B se muestran los valores de  $CI_{50}$  para el EAC (2.07 mg/mL) y EAEsc (2.84 mg/mL) los cuales no fueron diferente significativamente entre sí, en cuanto al EAM (8.18 mg/mL) resulto ser 4 veces mayor y el NDGA (0.003 mg/mL) 690 veces menor en comparación con el  $CI_{50}$  del EAC indicando que (1) la preparación en escabache fue incapaz de afectar la capacidad de atrapamiento del EAC, en contraste con el efecto adverso del tratamiento térmico por microondas, que redujo en un 75% la capacidad de atrapamiento frente al EAC y (2) que el NDGA es más efectivo para atrapar al  $O_2^-$  que el EAC, EAEsc y EAM.

### 7.3 Radical hidroxilo.

En la Figura XVII se muestra la capacidad de los extractos de ajo (Panels A, B y C) y del DMTU (Panel D) para atrapar  $\text{OH}^\cdot$ . La capacidad de los EAC, EAEsc y EAM (Panels A, B y C) para atrapar al  $\text{OH}^\cdot$  fue significativa a partir de 0.1 mg/mL, respectivamente, mientras que para la DMTU (Panel D) fue de 0.002 mg/mL. Concentraciones de EAC, EAEsc y EAM mayores a 2.6 mg/mL interfieren con el ensayo (valores no mostrados).

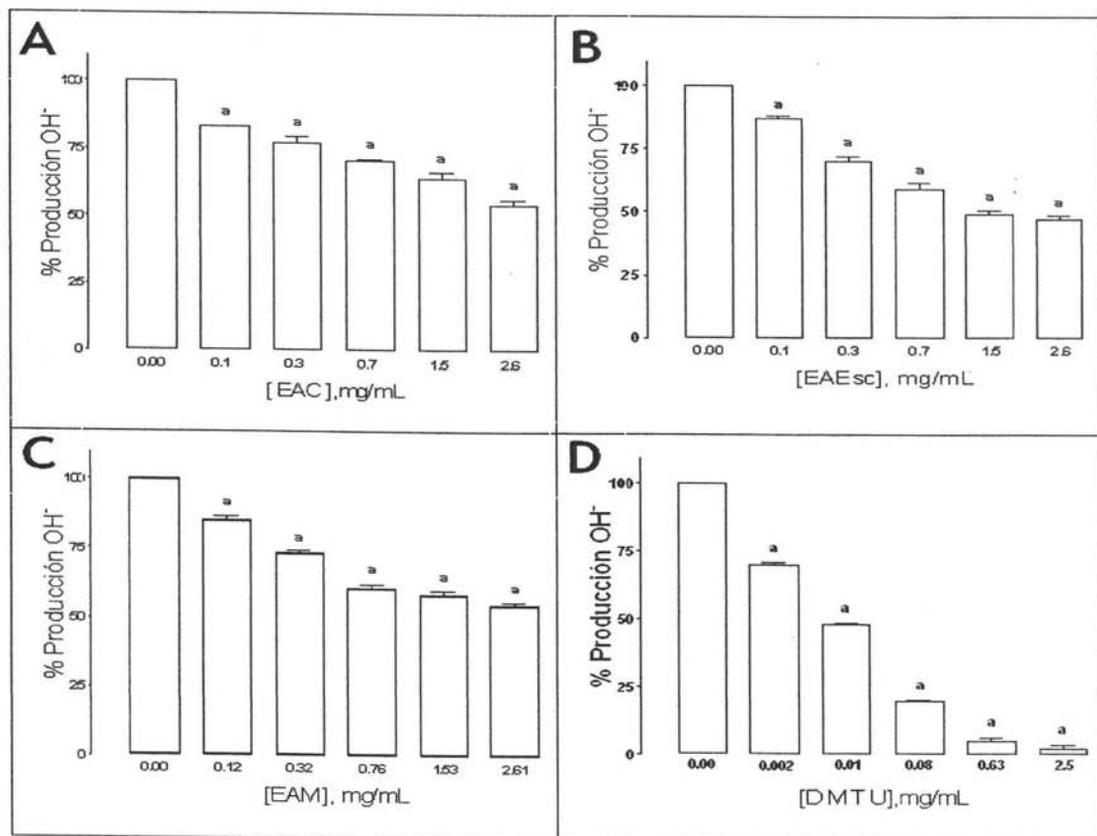


Figura XVII. Efecto de concentraciones crecientes de extracto de ajo crudo (A), extracto de ajo en escabeche (B), extracto de ajo microhomeado (C) y de la DMTU (D) sobre la producción del radical  $\text{OH}^\cdot$ . Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE. n = 4. a =  $p < 0.001$  vs valor de referencia.

La comparación de la capacidad de atrapamiento se hizo mediante el % máximo de atrapamiento. El valor de % máximo de atrapamiento del EAC (45.83 %) (Figura XVIII, Panel B) fue similar al del EAEsc (52.75 %) y EAM (45.59 %) lo que sugiere que la capacidad para atrapar el  $\text{OH}^\cdot$  es igual. El % máximo de atrapamiento para la DMTU (97.75 %) fue significativamente más alta que los EAC, EAEsc y EAM. Lo que sugiere que la capacidad de atrapamiento del EAC se mantiene a pesar del tratamiento térmico por microondas o la preparación en escabeche y que la DMTU es más efectiva para atrapar el  $\text{OH}^\cdot$  que el EAC, EAEsc y el EAM.

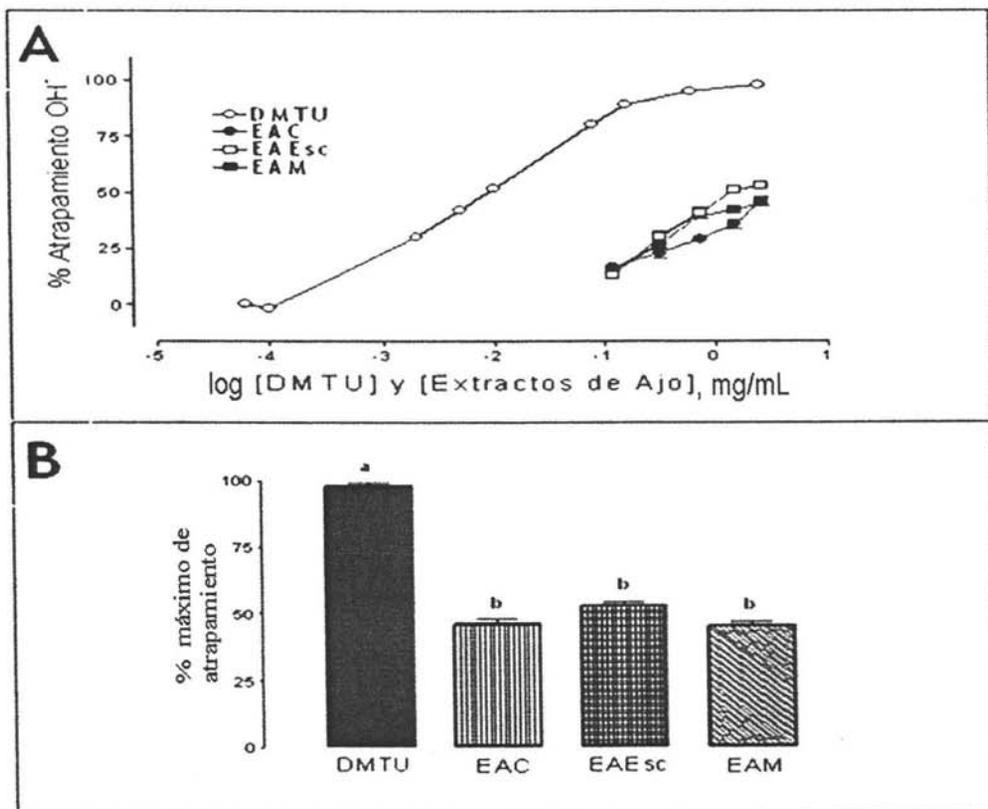


Figura XVIII. El panel A muestra los porcentajes de atrapamiento de  $\text{OH}^\cdot$  de los tres extractos y de la DMTU. El panel B muestra los valores de % de atrapamiento máximo. Las barras con la misma letra no muestran diferencia significativa,  $a = p < 0.001$  vs  $b$ . Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE.  $n = 4$ .

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

---

## 8. DISCUSIÓN.

La observación de que el EAC es capaz de atrapar al  $\text{OH}^\cdot$ , al  $\text{H}_2\text{O}_2$  y a el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Figura XIV, Panel A; Figura XVI, Panel A; Figura XVIII, Panel A), ya había sido reportado en estudios tanto *in vivo* (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2001) como *in vitro* (Avila, 2004; Prasad *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001) lo que explica en parte, las propiedades antioxidantes del EAC (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2000a; Sener *et al.*, 2003; Rietz *et al.*, 1993; Thabrew *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2002b; Banerjee *et al.*, 2003a; Mukherjee *et al.*, 2002), lo anterior puede deberse al hecho de que la alicina, componente mayoritario en el EAC (Block, 1985) tiene propiedades antioxidantes (Prasad *et al.*, 1995; Vimal & Devaki, 2004; Astashkin *et al.*, 2003; Mo *et al.*, 2003).

La capacidad del EAM y del EAEsc para atrapar el  $\text{OH}^\cdot$ , el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  fue preservada (Figura XIV, Panel A; Figura XVI, Panel A; Figura XVIII, Panel A), con la siguiente excepción, la capacidad del EAM para atrapar el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  decreció pero no se eliminó (Figura XVI, Panel B). Estos datos sugieren que la propiedad antioxidante del ajo no depende de la actividad de la alinasa, propuesta que concuerda con el hecho de que la actividad de la alinasa no está relacionada con la capacidad del EAC para inhibir la lipoperoxidación inducida por  $\text{Cu}^{2+}$  de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) en suero humano (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2004b).

El hecho de que el EAM y el EAEsc presenten capacidad de atrapamiento ante el  $\text{OH}^\cdot$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden ser explicados, en parte, por la observación de que la alina, componente mayoritario en ambos extractos, es capaz de atrapar al  $\text{OH}^\cdot$  (Kourounakis & Rekka, 1991) y al  $\text{H}_2\text{O}_2$  además de inhibir la lipoperoxidación (Ide *et al.*, 1996) y la oxidación de las LDL (Ho *et al.*, 2001).

A pesar de que existen numerosas evidencias que respaldan los resultados obtenidos existen reportes en los que se dice que el tratamiento en microondas reduce las propiedades anticancerígenas (Song & Milner, 1999) y que el calentamiento de dientes de ajo por 10 min. a  $100^\circ\text{C}$  reduce su efectividad ante *Helicobacter pylori* (Cellini *et al.*, 1996), lo que sugiere que sólo algunas de las propiedades características del ajo pueden permanecer sin modificación después de la inhibición de la alinasa, como es el caso de su capacidad para atrapar ERO.

---

La eficiencia del EAC fue equiparable a la del piruvato y la DMTU, ya que tan sólo es 1.4 y 2 veces menor su capacidad para atrapar la especie reactiva correspondiente, por lo que 1.5mg/mL de EAC son tan efectivos como 1 mg/mL de piruvato o bien 2.6 mg/mL de EAC tiene una capacidad comparable con 1.5 mg/mL de DMTU. Dicha capacidad antioxidante para el EAC también ha sido comparada con la vitamina C y la vitamina E y se ha encontrado que 1 mg/mL de EAC es tan efectivo como 5.28 mg o 12.9 mg, respectivamente (Popov *et al.*, 1992).

Como perspectivas se propone estudiar la capacidad del EAC, EAEsc y EAM para atrapar el singulete de oxígeno, el peroxinitrito y el ácido hipocloroso, cuya participación es importante en el estrés oxidativo (Vaananen *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2005).

---

## 9. CONCLUSIONES.

Con base a los resultados obtenidos se llegó a las siguientes conclusiones:

El presente estudio *in vitro* sugiere que (1) la capacidad para atrapar las ERO del EAC, el EAEsc y el EAM no esta relacionada con la actividad de la alinasa, y que (2) el compuesto o los compuestos involucrados en la capacidad antioxidante de los extractos de ajo son estables al calentamiento.

---

## 10. REFERENCIAS.

- Abadeh S, Case PC, Harrison R (1993) Purification of xanthine oxidase from human heart. *Biochem Soc Trans* 21:99S.
- Adachi T, Fukushima T, Usami Y, Hirano K (1993) Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial cell surface. *Biochem J* 289:523-27.
- Aebi HE (1984) Catalase *in vitro*. *Meth Enzymol* 105:121-6.
- Agarwal KC (1996) Therapeutic actions of garlic constituents. *Med Res Rev* 16:111-124.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2001) Molecular Biology of the cell, Fourth edition, *Garland Science* 269-71.
- Ames BN, Shigenaga MK (1992) Oxidant are a major contributor to aging. *Ann NY Acad Sci* 663: 85-96.
- Andrews NC (2000) Iron Metabolism: Iron deficiency and iron overload. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1:75-98.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373-99.
- Aruoma OI, Spencer PE, Warren D, Jenner P, Butler J, Halliwell B (1997) Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. *Food Chem* 60:149-56.
- Astashkin EI, Khokhlova OA, Til'kunova NA, Zalepugin DY, Glezer MG, Grachev SV (2003) Allicin suppresses the production of oxygen radicals by human neutrophils induced by various stimulating agents. *Dokl Biol Sci* 389:188-91.
- Aukrust P, Svardal AM, Muller F, Lunden B, Berge RK, Froland SS (1995) Decreased levels of total and reduced glutathione in CD4+ lymphocytes in common variable immunodeficiency are associated with activation of the tumor necrosis factor system: possible immunopathogenic role of oxidative stress. *Blood* 86:1383-91.
- Avila R (2004) Actividad antioxidante *in vitro* de preparaciones comerciales y extractos de ajo. Tesis de licenciatura, Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química. UNAM, México D.F. Pág. 47.
- Babior BM (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* 93:1464-76.
- Banerjee SK, Maulik SK (2002) Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutr J* 1:4.
- Banerjee SK, Dinda AK, Manchanda SC, Maulik SK (2002a) Chronic garlic administration protects rat heart against oxidative stress induced by ischemic reperfusion injury. *BMC Pharmacol* 2:16.
- Banerjee SK, Maulik M, Mancahanda SC, Dinda AK, Gupta SK, Maulik SK (2002b) Dose-dependent induction of endogenous antioxidants in rat heart by chronic administration of garlic. *Life Sci* 70:1509-1518.
- Banerjee SK, Maulik M, Dinda AK, Talwar KK, Maulik SK (2003a) Protection against acute adriamycin-induced cardiotoxicity by garlic: role of endogenous antioxidants and inhibition of TNF-alpha expression. *BMC Pharmacol* 3:16.
- Banerjee SK, Mukherjee K, Maulik SK (2003b) Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. *Phytother Res* 17:97-106.
- Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78:574-81.
- Berry CE, Hare JM (2003) Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 555:589-606.
- Bianchini F, Vainio H (2001) Allium vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer? *Environ Health Perspec* 109:893-902.
- Bielski BHJ, Shlue GG, Bajuk S (1980) Reduction of nitro blue tetrazolium by CO<sub>2</sub><sup>-</sup> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> radicals. *J Phys Chem* 84:830-33.
- Block E (1985) The chemistry of garlic and onions. *Sci Am* 252:114-19.
- Block G (1991) Vitamin C and cancer prevention: the epidemiological evidence. *Am J Clin Nutr* 53:270S-82S.

- 
- Boveris A, Cadenas E (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 54:311-14.
- Cappola TP, Kass DA, Nelson GS, Berger RD, Rosas GO, Kobeissi ZA, Marbán E, Hare JM (2001) Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 104:2407-11.
- Cellini L, Di Campli E, Masulli M, Bartolomeo S, Allocati N (1996) Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunol Med Microbiol* 13:273-77.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278:36027-31.
- Cross CE, Valacchi G, Scock B, Wilson M, Weber S, Eiserich J, van der Vliet A (2002) Environmental oxidant pollutant effects on biologic systems: a focus on micronutrient, antioxidant-oxidant interactions. *Am J Respir Crit Care Med* 166:S44-50.
- Demopoulos HB, Flamm E, Seligman M, Pietronigro DD (1982) Oxygen free radicals in central nervous system, ischemia and trauma In Autor AP(ed) Pathology of Oxygen 127-55.
- Deschamps V, Barberger-Gateau P, Peuchant E, Orgogozo JM (2001) Nutritional factors in cerebral aging and dementia: epidemiological arguments for a role of oxidative stress. *Neuroepidemiology* 20:7-15.
- Dillon SA, Lowe G, Billington D, Rahman K (2002) Dietary supplementation with aged garlic extract reduces plasma and urine concentrations of 8-iso-prostaglandin F(2 alpha) in smoking and nonsmoking men and women. *J Nutr* 132:168-171.
- Ding X, Hiraku Y, Ma N, Kato T, Saito K, Nagahama M, Semba R, Kuribayashi K, Kawanishi S (2005) Inducible nitric oxide synthase-dependent DNA damage in mouse model of inflammatory bowel disease. *Cancer Sci* 96:157-63.
- Diplok AT, Charleux JL (1998) Functional food science and defense against reactive oxidative species. *Int J Nutr* 80(Suppl 1):S77- 112.
- Farber JM & Levine RL (1986) Sequence of a peptide susceptible to Mixed-Function Oxidation. *J Biol Chem* 26:4574-78.
- Feinendegen LE (2002) Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents. *Hum Exp Toxicol* 21:85-90.
- Fessenden RJ, Fessenden JS (1983) Química Orgánica, Primera edición, Grupo Editorial Iberoamericana, México, 223-45.
- Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R (2001) Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch Biochem Biophys* 389:84-93.
- Frederiks WM, Vreeling-Sindelarova H (2002) Ultrastructural localization of xanthine oxidoreductase activity in isolated rat liver cells. *Acta Histochem* 104:29-37.
- Fridovich I (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201:1203-9.
- Fridovich I (1999) Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen. *Ann NY Acad Sci* 893:13-18.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494-501.
- Haan JB, Cristiano F, Ianello RC, Kola I (1995) Cu/Zn-Superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. *Biochem Mol Biol Int* 35:1281-97.
- Halliwell B (1990) How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad Res Commun* 9:1-32.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1981) Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Lett* 128:347-52.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1985) Hydroxyl radicals assayed by aromatic hydroxylation and deoxyribose degradation. In CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. RA Greewald (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 307:108-12.

- Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI (1987) The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 165:215-19.
- Harris ED (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 6:2675-83.
- Harrison PM, Hoare RJ (1980) Metal in Biochemistry, Chapman and Hall, USA, 46-60.
- Harrison R (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radic Biol Med* 33:774-97.
- Higuchi Y (2003) Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 66:231-51.
- Hille R, Massey V (1981) Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. *J Biol Chem* 256:9090-95.
- Hirata R, Matsushita S (1996) Reducing activity level of alliin. *Biosci Biotech Biochem* 60:484-5.
- Ho YS, Howard AJ, Crapo JD (1991) Molecular structure of a functional rat gene for manganese containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4:278-86.
- Ho SE, Ide N, Lau BH (2001) S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine* 8:39-46.
- Ide N, Matsuura H, Itakura Y (1996) Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother Res* 1996, 10:340-341.
- Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T (1994) Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int* 45:1-9.
- Imlay JA (2003) Pathways of oxidative damage. *Ann Rev Microbiol* 57: 395-418.
- Jansen H, Muller B, Knobloch K (1989) Characterization of an alliin lyase preparation from garlic (*Allium sativum*). *Plant Med* 55:434-39.
- Jiang Z-Y, Hunt JV, Wolff SP (1992) Ferrous ion oxidation in the presence of the xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low-density lipoprotein. *Anal Biochem* 202:384-89.
- Kanehira T, Takekoshi S, Nagata H, Matsuzaki K, Kambayashi Y, Osamura RY, Homma T (2003) A novel and potent biological antioxidant, Kinobeaon A, from cell culture of safflower. *Life Sci* 74:87-97.
- Kagawa K, Matsutaka H, Yamaguchi Y, Fukuhama C (1986) Garlic extract inhibits the enhanced peroxidation and production of lipids in carbon tetrachloride-induced liver injury. *Jpn J Pharmacol* 42:19-26.
- Kehrer JP (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149:43-50.
- Keaney JF (2000) Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Asp Med* 21:99-166.
- Kim K.M., Chun S.B., Koo M.S., Choi W.J., Kim T.W., Kwon Y.G., Chung H.T., Billiar T.R., Kim Y.M., 2001. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radical Biology & Medicine* 30, 747-756.
- Klotz L-O. (2002) Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biol Chem* 383:443-56.
- Koch HP, Lawson LD (1994) Garlic, the science and therapeutic application of *Allium Sativum* L., and related species, William & Wilkins, Baltimore.
- Kourounakis PN, Rekkas EA (1991) Effect on active oxygen species of alliin and *Allium sativum* (garlic powder). *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 74:249-52.
- Kristal BS, Yu BP (1992) An emerging hypothesis synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions. *J Gerontol* 47:B104-B7.
- Lambert JD, Zhao D, Meyers RO, Kuester RK, Timmermann BN, Dorr RT (2002) Nordihydroguaiaretic acid: hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicol* 40:1701-08.
- Lau BHS (2001) Suppression of LDL oxidation by garlic. *J Nutr* 131:958S-88S.
- Lawson, L.D. (1993) Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products: role in reducing blood lipids. *Chem Abst* 119:216-660.

- Lawson LD (1994) Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products. In *Human Medicinal Agents from Plants*, Kinghorn AD, Balandrin MF (eds) American Chemical Society: Washington DC, 306-30.
- Lawson LD (1996) The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In: Koch HP, Lawson LD (Eds.) *Garlic The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and related species*. Williams and Wilkins Press, USA. 37-107.
- Lawson LD (1998) Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. In *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity*. Edited by Lawson LS, Bauer R. Washington, DC American Chemical Society 176-209.
- Lee H L & Halliwell B (2001) Antioxidant & prooxidant habilities of foods and beverages. *Meth Enzymol* 335:181-90.
- Lesnefsky E J, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL (2001) Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33:1065-89.
- Loschen G, Flohe L, Chance B (1971) Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett* 18:261-264.
- Markesbery WR, Carney JM (1999) Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 9:133-46.
- Marletta MA (1989) Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem Sci* 14: 488-92.
- Massey V (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J Biol Chem* 269:22459-62.
- Matés M (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153:83-104.
- Mathews CK, Van Holde KE (1996) Nucleotide metabolism. In *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> edn, Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Menlo Park, CA, USA. 793.
- Matsubara S, Sato I (2001) Enzyme histochemically detectable NAD(P)H oxidase in human placental trophoblasts: normal, preeclamptic, and fetal growth restriction-complicated pregnancy. *Histochem Cell Biol* 116:1-7.
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erithrocuprein(hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-55.
- Meister A (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263:17205-08.
- Mills GC (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem.* 229:189-97.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trend Plant Sci* 7:405-10.
- Mo SJ, Son EW, Rhee DK, Pyo S (2003) Modulation of TNF-alpha-induced ICAM-1 expression, NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by alginate, allicin and ascorbic acid in human endothelial cells. *Arch Pharm Res* 26:244-51.
- Mukherjee S, Banerjee SK, Maulik M, Dinda AK, Talwar KK, Maulik SK (2002) Chronic garlic administration protects rat heart against oxidative stress induced by ischemic reperfusion injury. *BMC Pharmacol* 2:16.
- Murrant CL, Reid MB (2001) Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech* 55:236-48.
- Muxfeldt M, Schaper W (1987) The activity of xanthine oxidase in heart of pigs, guinea pigs, rabbits, rats, and humans. *Basic Res Cardiol* 82:486-92.
- Nair J, Barbin A, Velic I, Bartsch H (1999) Etheno-DNA base adduct from endogenous reactive species. *Mutat Res* 424:59-69.
- Naito S, Yamaguchi N, Yokoo Y (1981) Studies on natural antioxidant. III. Fractionation of antioxidant activity from garlic extract. *J Jpn Soc Food Sci Tehnol* 28:465-70.
- Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H (1989) Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene* 79:279-88.
- Nelson DL, Cox MM (2000) Lehninger Principles of Biochemistry, Third edition, Worth Publishers, New Cork, Capitulo 19: Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation, 659-90.

- Olson JS, Ballou DP, Palmer G, Massey V (1974) The reaction of xanthine oxidase with molecular oxygen. *J Biol Chem* 249:4350-62.
- Owen PL, Johns T (1999) Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *J Ethnopharmacol* 64:149-60.
- Papp E, Nardai G, Soti C, Csérmeley P (2003) Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis. *Biofactors* 17:249-57.
- Parks DA, Granger DN (1986) Xanthine oxidase: biochemistry, distribution, and physiology. *Acta Physiol Scand* 548:87-99.
- Pedraza-Chaverri J, Tapia E, Medina-Campos ON, de los Angeles Granados M, Franco M (1998) Garlic prevents hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Life Sci* 62:PL71-PL77.
- Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MA, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME (2000a) Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 29:602-611.
- Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Granados-Silvestre MA, Maldonado PD, Olivares-Corichi IM, Hernandez-Pando R (2000b) Garlic ameliorates hyperlipidemia in chronic aminonucleoside nephrosis. *Mol Cell Biochem* 211:69-77.
- Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MD, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Olivares-Corichi IM, Ibarra-Rubio ME (2001) Post-transcriptional control of catalase expression in garlic-treated rats. *Mol Cell Biochem* 216:9-19.
- Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macías-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, Castro L, Salcedo MI, Hernández-Pando R (2004a) S-allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and singlet oxygen *in vitro* and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage *in vivo*. *BMC Clin Pharmacol* 4:5.
- Pedraza-Chaverri J, Gil-Ortiz M, Albarrán G, Barbachano-Esparza L, Menjívar M, Medina-Campos O (2004b) Garlic stability to prevent *in vitro* Cu<sup>2+</sup>-induced lipoprotein oxidation in human serum is preserved in heated garlic: effect unrelated to Cu<sup>2+</sup>-chelation. *J Nutr* 1:10.
- Pereira-Smith OM, Smith JR (1988) Genetic analysis of indefinite division in human cell: identification of four complementation groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6042-46.
- Pinto JT, Rivlin RS (2001) Antiproliferative effects of *allium* derivatives from garlic. *J Nutr* 131:1058S-60S.
- Popov I, Blumstein A, Lewin G (1994) Antioxidant effects of aqueous garlic extract. 1<sup>st</sup> communication: Direct detection using the photochemiluminescence. *Arzneimittelforschung* 44:602-4.
- Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL (1995) Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Mol Cell Biochem* 148:183-189.
- Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL (1996) Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic. *Mol Cell Biochem* 154:55-63.
- Price Ved, Sterling WR, Tarantola VA, Hartley RW, Rechcigl M (1962) The kinetics of catalase synthesis and destruction *in vivo*. *J Biol Chem* 237:3468-75.
- Pritsos CA (2000) Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthineoxidoreductase enzyme system. *Chem Biol Interact* 129:195-208.
- Radi R, Rubbo H, Bush K, Freeman BA (1997) Xanthine oxidase binding to glycosaminoglycans: kinetics and superoxide dismutase interactions of immobilized xanthine oxidase-heparin complexes. *Arch Biochem Biophys* 339:125-35.
- Rahman K (2003) Garlic and aging: new insights into an old remedy. *Ageing Res Rev Jan* 2:39-56.
- Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR (1980) Techniques in free radical research, Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology Vol. 8, Elsevier, Netherlands, 1-18.
- Rietz B, Isensee H, Strobach H, Makedessi S, Jacob R (1993) Cardioprotective actions of wild garlic (*allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 119:143-150.
- Robinson MK, Rodrick ML, Jacobs DO, Rounds JD, Collins KH, Saporoschetz IB, Mannick JA, Wilmore DW (1993) Glutathione depletion in rats impairs T-cell and macrophage immune function. *Arch Surg* 128:29-34.

- Rouquette M, Page S, Bryant R, Benboubetra M, Stevens CR, Blake DR, Whish WD, Harrison R, Tosh D (1998). Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localized on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture. *FEBS Lett* 426:397-401.
- Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA (1991) Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 88:1886-93.
- Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A (2002) Oxidized low-density lipoprotein induced-apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585:213-21.
- Sener G, Satyrolu H, Ozer Schirli A, Kacmaz A (2003) Protective effect of aqueous garlic extract against oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Life Sci* 73:81-91.
- Sheela CG, Augusti KT (1995) Antiperioxide effects of S-allylcysteine sulphoxide isolated from *Allium sativum* Linn and guggulipid in cholesterol diet fed rats. *Indian J Exp Biol* 33:337-41.
- Slivka A, Mytilineou C, Cohen G (1987) Histochemical evaluation of glutathione in brain. *Brain Res* 409:275-84.
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 531:231-51.
- Smith MJ, Inserra PF, Watson RR, Wise JA, O'Neill KL (1999) Supplementation with fruit and vegetable extracts may decrease DNA damage in the peripheral lymphocytes of an elderly population. *Nutr Res* 19:1507-18.
- Song K, Milner J (1999) Heating garlic inhibits its ability to suppress 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced DNA adduct formation in rat mammary tissue. *J Nutr* 129:657-661.
- Song K, Milner J (2001) The influence of heating on the anticancer properties of garlic. *J Nutr* 131:1054S-7S.
- Staal FJ, Ela SW, Roederer N, Anderson MT, Herzenberg LA, Herzenberg LA (1992) Glutathione deficiency and human immunodeficiency virus infection. *Lancet* 339:909-12.
- Stadtman ER (2004) Cyclic oxidation and reduction of methionine residues of proteins in antioxidant defense and cellular regulation. *Arch Biochem Biophys* 423:2-5.
- Stadtman ER, Berlett BS (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 10:485-94.
- Stadtman ER, Levine RL (2000) Protein oxidation. *Ann NY Acad Sci* 899:191-208.
- Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF (1990) FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 168:558-65.
- Sukhjit KS, Gurcharan K (2002) Alterations in oxidative stress scavenger system in aging rat brain and lymphocytes. *Biogerontology* 3:161-73.
- Sundaram SG, Milner JA (1996a) Diallyl disulfide inhibits the proliferation of human tumor cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1315:15-20.
- Sundaram SG, Milner JA (1996b) Diallyl disulfide induces apoptosis of human colon tumor cells. *Carcinogenesis* 17:669-73.
- Thabrew MI, Samarawickrema NA, Chandrasena LG, Jayasekera S (2000) Protection by garlic against adriamycin induced alterations in the oxido-reductive status of mouse red blood cells. *Phytother Res* 14:215-217.
- Urso ML, Clarkson PM (2003) Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189:41-54.
- Vaananen AJ, Kankuri E, Rauhala P (2005) Nitric oxide-related species-induced protein oxidation: Reversible, irreversible, and protective effects on enzyme function of papain. *Free Radic Biol Med* 38:1102-11.
- Vickers S, Schiller HJ, Hildreth JEK, Bulkley GB (1998) Immunoaffinity localization of the enzyme xanthine oxidase on the outside surface of endothelial cell plasma membrane. *Surgery* 124:551-60.
- Victor VM, Rocha M, De La Fuente M (2004) Immune cells: Free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol* 4:327-47.
- Vimal V, Devaki T (2004) Hepatoprotective effect of allicin on tissue defense system in galactosamine/endotoxin challenged rats. *J Ethnopharmacol* 90:151-4.

- 
- Vorbach C, Scriven A, Capecchi MR (2002) The housekeeper gene *xanthine oxidoreductase* is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: gene sharing in the lactating mammary gland. *Genes Dev* 16:3223-35.
- Wallace DC (2000) Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease. *Am Heart J (suppl)* 139:s70-85.
- Walter PD, Shah SV (1988) Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest* 81: 334-41.
- Wei Z, Lau BHS (1998) Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutr Res* 18:61-70.
- Weiss SJ (1986) Oxygen, ischemia, and inflammation. *Acta Physiol Scand* 548:9-37.
- Wood D (2001) Established and emerging cardiovascular risk factors. *Am Heart J* 141:S49-57.
- Xia M, Dempski R, Hille R (1999). The reductive half-reaction of xanthine oxidase – reaction with aldehyde substrates and identification of the catalytically labile oxygen. *J Biol Chem* 274:3323-30.
- Youdim KA, Joseph JA (2001) A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radic Biol Med* 30:583-94.
- Yves C (2000) Oxidative stress and Alzheimer' disease. *Am J Clin Nutr* 71:621S-29S.

## 11. APENDICE.

### 11.1 Lista de reactivos, preparación de soluciones y curva estándar, empleados en el ensayo $Fe^{3+}$ -naranja de xilenol (FOX).

LISTA DE REACTIVOS	
Reactivos	PM (g/mol)
Sulfato ferroso amoniacal	392.14
Naranja de xilenol	760.6
Hidroxitolueno butilado	220.4
Metanol grado HPLC	32.04
Peróxido de hidrógeno	34.01
Ácido sulfúrico	98.08

#### Preparación de soluciones:

- **Reactivo de FOX** (metanol 90%; naranja de xilenol 100  $\mu$ M; hidroxitolueno butilado 4 mM y ácido sulfúrico 25 mM).

Mezclar 9 volúmenes de reactivo 1 con 1 volumen de reactivo 2.

**Reactivo 1:** hidroxitolueno butilado 4 mM.

**Reactivo 2:** naranja de xilenol 1 mM y sulfato ferroso amoniacal 2.56 mM.

Mezclar todo el volumen de ambos reactivos.

#### Curva estándar de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ):

Para preparar la curva estándar de peróxido de hidrógeno se parte de una solución "stock" de peróxido de hidrógeno 200  $\mu$ M, solución que se prepara mezclando 2.26  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno al 30% en 99.997 mL de agua.

Estándar	$[H_2O_2]$ $\mu$ M	$\mu$ L de $H_2O_2$ , 200 $\mu$ M	$\mu$ L de $H_2O$
Blanco	0	0	1000
1	2.5	12.5	987.5
2	5	25	975
3	10	50	950
4	25	125	875
5	50	250	750
6	75	376	624

---

**11.2 Lista de reactivos y preparación de soluciones, empleados en el sistema xantina/xantina oxidasa.**

LISTA DE REACTIVOS	
Reactivos	PM (g/mol)
Xantina	152.1
Nitroazul de tetrazolio	817.6
Bicarbonato de sodio	106.99
Xantina oxidasa	---
Fosfato de potasio monobásico	136.09
Fosfato de sodio dibásico	141.96

**Preparación de soluciones:**

- **Amortiguador de fosfatos** 50 mM, pH 7.0
- **Xantina** 0.3 mM.

Colocar 11.4 mg de xantina en un tubo de vidrio de 12 x 75 mm con 2 mL de bicarbonato de sodio 0.4 M, agitar en vórtex hasta que la xantina se disuelva y por último aforar a 250 mL con H<sub>2</sub>O.

- **Nitroazul de tetrazolio (NBT)** 150 µM.

Disolver 0.0368 g en 300 mL de agua destilada, Guardar a 4 °C en frasco de vidrio ámbar.

- **Bicarbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)** 0.4 M.

Disolver 21.2 g en 500 mL de agua destilada. Guardar en refrigeración.

- **Xantina oxidasa (EC 1.1.3.22)** 168 U/L

La solución de la enzima se prepara dependiendo del número de muestras y de la actividad específica reportada en el envase, Ejemplo: La presentación comercial utilizada reporta que 1 mg de sólido equivale a 0.06 U:

$$\begin{array}{l} 0.06 \text{ U} \text{ ----- } 1 \text{ mg} \qquad \qquad \qquad 2800 \text{ mg} \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \\ \\ 168 \text{ U} \text{ ----- } X = 2800 \text{ mg} \qquad \qquad X = 11.2 \text{ mg} \text{ ----- } 4 \text{ mL} \end{array}$$

Por lo que hay que pesar 11.2 mg de la enzima y disolverla en 4 mL de agua destilada.

---

**11.3 Lista de reactivos, preparación de soluciones y curva estándar, empleados en el sistema del  $Fe^{3+}$ -EDTA- $H_2O_7$ -desoxirribosa.**

LISTA DE REACTIVOS	
Reactivos	P.M. (g/mol)
Ácido ascórbico	176.1
Desoxirribosa	134.1
Tetrametoxipropano.	164.2
Deferoxamine mesilada	656.8
Ácido tiobarbitúrico	144.1
Cloruro ferrico	162.21
Peróxido de hidrógeno	34.01
Ácido etilendiaminotetracético	372.25
Ácido clorhídrico	36.5
Fosfato de potasio dibásico	228.23
Fosfato de potasio monobásico	136.09

**Preparación de soluciones:**

- **Reactivo TBA / TCA / HCl / DFO.**

Disolver 0.1875 mg de ácido tiobarbitúrico (TBA), en 41.5 mL de agua destilada y 1.04 mL de HCl concentrado, 30 minutos antes de usar este reactivo añadir 7.5 mL de ácido tricloroacético 100% (TCA) y 0.033 mg de deferoxamina mesylate (DFO). NOTA: Preparar aproximadamente 2 horas antes ya que el TBA tarda en disolverse y hay que mantenerlo protegido de la luz.

- **Ácido ascórbico 1 mM.**

Disolver 1.67 mg de ácido ascórbico en 10 mL de amortiguador de  $K_2PO_4$  20 mM, pH 7.4.

- **Desoxirribosa 2.8 mM.**

Disolver 3.77 mg de desoxirribosa en 10 mL de amortiguador de  $K_2PO_4$  20 mM pH 7.4.

- **Peróxido de hidrógeno 10 mM.**

Adicionar 11.33  $\mu$ L de  $H_2O_2$  al 30% en 9.988 mL de agua destilada.

- **EDTA/ $FeCl_3$  1.04 mM/1 mM**

Disolver 3.85 mg de EDTA y 1.62 mg de  $FeCl_3$  en 10 mL de amortiguador de  $K_2PO_4$  20 mM pH 7.4.

---

**Curva estándar de tetrametoxipropano (1,1,3,3-tetrametoxipropano (malondialdehído bis(dimetil acetil))):**

1) **Solución “stock A” de tetrametoxipropano (TMPO)** 74.08 mM.

Adicionar 10  $\mu$ l de TMPO en 812  $\mu$ L de amortiguador de  $K_2PO_4$  20 mM, pH 7.4.

2) **Solución “stock B” de TMPO** 74.08  $\mu$ M.

Adicionar 10  $\mu$ l de sol. “stock A” de TMPO en 9.99 mL de amortiguador de  $K_2PO_4$  20 Mm, pH 7.4

Para la curva estándar se usará la sol. “stock B” de tetrametoxipropano.

Estándar	nmoles malonaldehído	$\mu$ l de “stock B” TMPO	$\mu$ l de amortiguador de $K_2PO_4$ 20 mM pH 7.4
Blanco	0	0	1000
1	0.37	10	990
2	0.74	20	980
3	1.48	40	960
4	2.96	80	920
5	7.40	200	800
6	14.8	400	600