



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**SÍNTESIS DE S- ALILCISTEÍNA.  
UN COMPUESTO DEL AJO CON PROPIEDADES  
ANTIOXIDANTES.**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**ADRIANA AGUILAR GONZÁLEZ**



**MÉXICO, D. F.**

**2008**



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	Profesor: Ernestina Cervera Flores
Vocal	Profesor: Helgi Helen Junk Cook
Secretario	Profesor: Perla Maldonado Jiménez
1er. Suplente	Profesor: Araceli Patricia Peña Álvarez
2°. Suplente	Profesor: María Eva González Trujillo

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Patología Vascul. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

Laboratorio 121. Conjunto E. Departamento de Farmacia.  
Facultad de Química. UNAM.

---

ASESOR DEL TEMA

Dra. Perla D. Maldonado Jiménez

---

SUPERVISOR TÉCNICO

Dr. Alfonso S. Lira Rocha

---

SUSTENTANTE

Adriana Aguilar González

*DEDICATORIAS*

*A MI MADRE.  
A MI QUERIDA HERMANA MARY.  
A MIS SOBRINOS DAVID ENOC Y PABLO NEHEMIAS.*

## AGRADECIMIENTOS.

### ❖ *A Dios.*

*Gracias por dejarme existir y considerarme en tus planes, gracias por amarme así, por ser mi refugio y amigo incondicional, por estar a mi lado siempre aún sin pedírtelo para darme tu consuelo, fortaleza y confianza. Gracias por los dones y favores brindados como la culminación de esta meta. A Ti sea la alabanza, la gloria, la honra y la adoración por siempre.*

### ❖ *A mi madre.*

*Tus luchas y esfuerzos valieron la pena, gracias por todo tu amor plasmado en mí y tu entrega para que yo sea quien soy. Este logro es parte de ti y sé que lo celebrarías más que nadie, tus enseñanzas se mantienen aun sin estar tú aquí, sabes dejar huella. Gracias madre mía.*

### ❖ *A mi única amada hermana Mary.*

*No hay palabras para agradecerte todo lo que has hecho durante estos últimos años. Tu comprensión y tu apoyo incondicional, consejos y desvelos son muestra de tu compromiso y empeño hacia la vida. Gracias por darme una familia, a la que amo y me ama en todo momento. Te amo y siempre serás para mí la mejor. Así también, gracias David por ser participe de este logro.*

### ❖ *A mi Flaquito Querido.*

*Agradezco a Dios a verte puesto como una de mis mayores bendiciones palpables, por mantenerte a mi lado y estar en las buenas y en las malas. Gracias flaquito mío, por tu determinación puesta en este tiempo para que yo sea cada día una mejor persona. Por los momentos de alegría, de risas, de comprensión y sobre todo de aguante durante este tiempo de escuela. Gracias...*

### ❖ *A la Dra Perla Maldonado.*

*Gracias Perla por darme la oportunidad de aprender en el laboratorio de PVC, gracias por la paciencia y por tener confianza en mí para que yo realizará este proyecto, gracias por enseñarme a ver que todo es posible con un poco de esfuerzo y entrega.*

### ❖ *Al Dr. Alfonso S Lira.*

*Por todo su apoyo durante estos años en los cuales fue parte de mi formación universitaria, gracias por sus consejos, por sus amonestaciones y por ser además de un profesor, un amigo que siempre estuvo para orientarme en esas cosas tan complicadas de la vida.*

### ❖ *A las Dras. María Elena Cháñez y Penélope Aguilera*

*Quiero agradecerles por hacerme sentir parte de un equipo de trabajo, por enseñarme y poner por ejemplo que si es posible tener un excelente ambiente de trabajo, gracias por darme algunos de sus amplios conocimientos con paciencia y ternura, me llevo de ustedes un gran cariño y aprecio.*

❖ *Chicas y chicos del laboratorio de PVC.*

*Gracias por los momentos que pasamos de alegría, de relaxo, de compañerismo. Sin ustedes el lab, no hubiera sido tan divertido y ameno como lo es, cada uno de ustedes forman parte importante de este logro. Gracias Selene (ahora sigues tu), Rán (gracias por quererme tanto, jaja), Danny (ya casi, ya te falta menos que tantito), Araceli (buza caperuza), Pablo (ánimo, todo lo puedes...no estas solito), Verito y Luis Rubén (que bien la pasamos, no vemos por aquellos sus rumbos), Carlos (por tus consejo, tus porras y tu compañía).*

❖ *Martín.....*

*No creas que te olvide y te deje al final de la lista, eh!!*  
*Oye mil gracias por todo tu apoyo en eso del HPLC, no se me olvidará todo lo que aprendí de ti, eso incluye tus miles de preguntas y cuestionamientos de la carrera y de la vida, mira que como sufrí, pero aprendí bien. Espero que sigamos en contacto. Un abrazo bien fuerte. Gracias por hacerme participe de tu círculo de trabajo.*

❖ *Laboratorio 121.*

*Marco, Carlitos, Paco y Cynthia, gracias por los ánimos y apoyo brindados en este tiempo y claro por soportar el agradable olor de la SAC, jeje*

❖ *A mis amigos de la Facultad.*

*Gracias Elsa, Faby, San, Hiraí, Jessica X, Vanne, Luis Fernando, Gus, Alma; por ser mis amigos, por formar parte de mi familia a su tiempo y por todo todos los conocimientos aprendidos juntos. Mil gracias.*

*No piensen que porque están al final de la lista, no son importantes, claro que lo son.*

❖ *Gracias Mili por tus porras y largas charlas sobre las cosas de la vida y por ser mi amiga y confidente del alma.*

❖ *Miguelito (bueno, que de Miguelito no tienes nada je je) gracias por tu apoyo moral y todos aquellos momentos en los que compartimos nuestros conocimientos científicos y de fe, el pasar tiempo contigo es una grata sensación.*

❖ *David Rodríguez... tantas cosas que decir y a la vez no, gracias por tu amistad durante estos años y por esos largos periodos de charla por correo, le diste un sabor diferente a mi vida académica, por no ser químico, jiji. Eres importante para mí, espero que no se te olvide. Gracias nuevamente.*



## ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	2
1. AJO .....	2
2. SAC, UN COMPUESTO CLAVE DEL EAE .....	6
3. RADICALES LIBRES .....	10
4. ESTRÉS OXIDATIVO .....	11
5. LIPOPEROXIDACIÓN .....	13
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	16
<b>IV. OBJETIVO GENERAL</b> .....	18
<b>V. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	18
<b>VI. HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>VII. METODOLOGÍA</b> .....	20
1. REACTIVOS.....	20
2. EQUIPO.....	21
3. METODOLOGÍA .....	22
A. PARTE QUÍMICA .....	22
a) Síntesis de la SAC, la SBC y la SPC.....	22
b) Identificación de la SAC, la SBC y la SPC .....	22
c) Determinación de pureza de la SAC, la SBC y la SPC .....	23
B. EVALUACIÓN IN VITRO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LA SAC, LA SBC Y LA SPC .....	23
a) Ensayo de actividad atrapadora para H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	23
b) Ensayo de actividad atrapadora para <sup>1</sup> O <sub>2</sub> .....	24
c) Ensayo de actividad atrapadora para HOCl.....	24
d) Ensayo de actividad atrapadora para ONOO <sup>-</sup> .....	25
e) Ensayo de actividad atrapadora para <sup>•</sup> OH .....	26
C. PARTE BIOLÓGICA .....	27
a) Ensayo de lipoperoxidación .....	27
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	27
<b>VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	28
A. PARTE QUÍMICA .....	28
a. Síntesis de la SAC, la SBC y la SPC.....	28
a) SAC .....	28
b) SBC .....	30
c) SPC.....	32
b. Determinación de pureza de la SAC, la SBC y la SPC.....	35
B. EVALUACIÓN IN VITRO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LA SAC, LA SBC Y LA SPC .....	36
a) Ensayo de actividad atrapadora para H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	37
b) Ensayo de actividad atrapadora para <sup>1</sup> O <sub>2</sub> .....	39
c) Ensayo de actividad atrapadora para HOCl.....	41
d) Ensayo de actividad atrapadora para ONOO <sup>-</sup> .....	43
e) Ensayo de actividad atrapadora para <sup>•</sup> OH .....	45
C. PARTE BIOLÓGICA .....	46
a) Ensayo de lipoperoxidación .....	46
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	49
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	50
<b>XI. ESPECTROS</b> .....	58



---

**ABREVIATURAS**

---

<i>CI<sub>50</sub></i>	<i>Concentración inhibitoria al 50%</i>
<i>ERN</i>	<i>Especies reactivas de nitrógeno</i>
<i>ERO</i>	<i>Especies reactivas de oxígeno</i>
<i>EAE</i>	<i>Extracto de Ajo Envejecido</i>
<i>LPx</i>	<i>Lipoperoxidación</i>
<i>MDA</i>	<i>Malondialdehído</i>
<i>TBARS</i>	<i>Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico</i>
<i>RL</i>	<i>Radical libre</i>
<i>SAC</i>	<i>S-alilcisteína</i>
<i>SBC</i>	<i>S-bencilcisteína</i>
<i>SPC</i>	<i>S-propilcisteína</i>

---



## I. RESUMEN

*Se ha sugerido que el estrés oxidativo y nitrosativo participa activamente en el mecanismo fisiopatológico de daño en diferentes enfermedades como el síndrome de isquemia-reperfusión, la diabetes, la artritis, la hipertensión, la colitis y diversas complicaciones cardíacas y renales. Por ello, la importancia de obtener compuestos antioxidantes que atrapen eficientemente las principales especies radicales de oxígeno y de nitrógeno que se generan en los sistemas biológicos.*

*La S-alilcisteína, es un compuesto sulfurado, hidrosoluble, estable y de olor característico, que está presente en el extracto de ajo envejecido. La S-alilcisteína ha demostrado tener propiedades antioxidantes en diferentes modelos tanto in vitro como in vivo. Sin embargo, debido al prolongado tiempo de extracción (20 meses), a su baja distribución natural (0.62 mg/g de extracto de ajo envejecido) y la importancia biológica y terapéutica que ha mostrado, resulta trascendental su obtención por síntesis orgánica.*

*En este proyecto se realizó la síntesis orgánica para la obtención de la S-alilcisteína en el laboratorio, a través de la reacción del clorhidrato de L-cisteína con el bromuro de alilo. El compuesto se caracterizó por métodos espectroscópicos (IR, RMN<sup>1</sup>H y EM) y cromatográficos. Además, se evaluó su capacidad antioxidante frente a diferentes especies radicales evaluando que parte de la molécula (grupo alilo y/o átomo de azufre) es la responsable de atrapar dichas especies. Para ello, se obtuvieron 2 derivados de la L-cisteína: la S-bencilcisteína y la S-propilcisteína. Se encontró que el sustituyente incorporado modifica la actividad antioxidante. En la mayoría de los casos la S-alilcisteína fue más activa que la S-bencilcisteína y/o la S-propilcisteína. Los resultados obtenidos, sugieren que las propiedades antioxidantes de la S-alilcisteína están asociadas con el átomo de azufre del tioéster; sin embargo ésta aumenta sustancialmente si se encuentra un sistema insaturado (grupo alilo) cercano al átomo de azufre.*



## II. ANTECEDENTES

### 1. AJO

Desde hace mucho tiempo, el ajo (*Allium sativum* L.) se ha utilizado como especia y como una planta medicinal. A principios del siglo pasado adquirió un gran interés científico por presentar diferentes efectos tales como: antimicrobiano, antimicótico, anticancerígeno, antihipertensivo, inmunosupresor, hipoglicémico, hipolipémico, antioxidante, entre otros [1].

Actualmente, el principal país productor y consumidor de este vegetal es China, seguido de la India (Figura 1) [2].

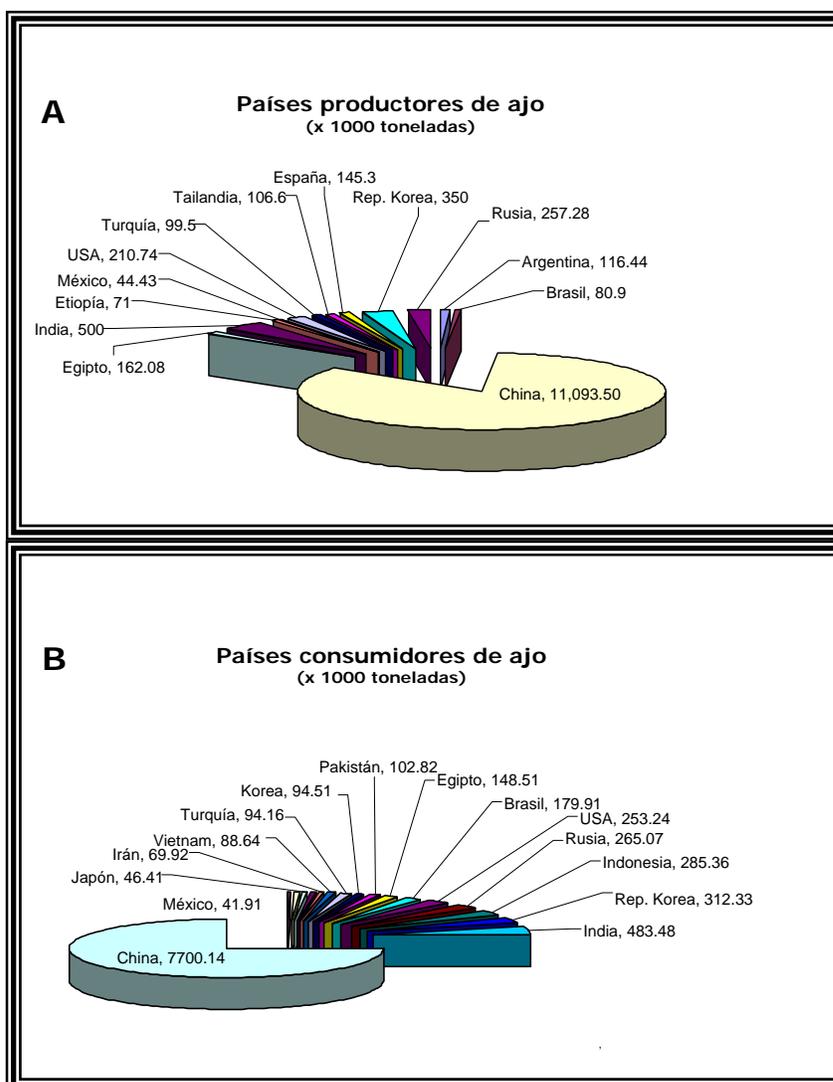


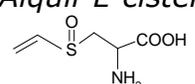
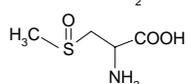
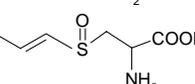
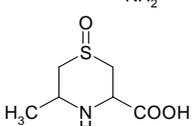
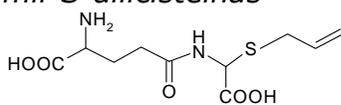
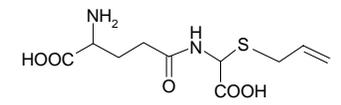
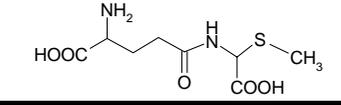
Figura 1. Países productores (A) y consumidores (B) de ajo en el año 2005.



El valor nutritivo del ajo es mayor que el otras especies de la misma familia (como la cebolla), ya que: contiene alrededor de 33 compuestos azufrados, varias enzimas, glucósidos esteroidales, lectinas, fructanos, pectinas, prostaglandinas, adenosina, vitaminas (como la B-1, B-2, B-6, C y E), antocianinas, flavonoídes, ácido nicotínico, ácidos grasos, glucolípidos, fosfolípidos, 17 aminoácidos (esenciales y fenólicos) y es una fuente rica de selenio [3-4].

Los sulfuros de cisteína y las  $\gamma$ -glutamilcisteínas son los compuestos mayoritarios en el ajo fresco (Tabla 1) [5].

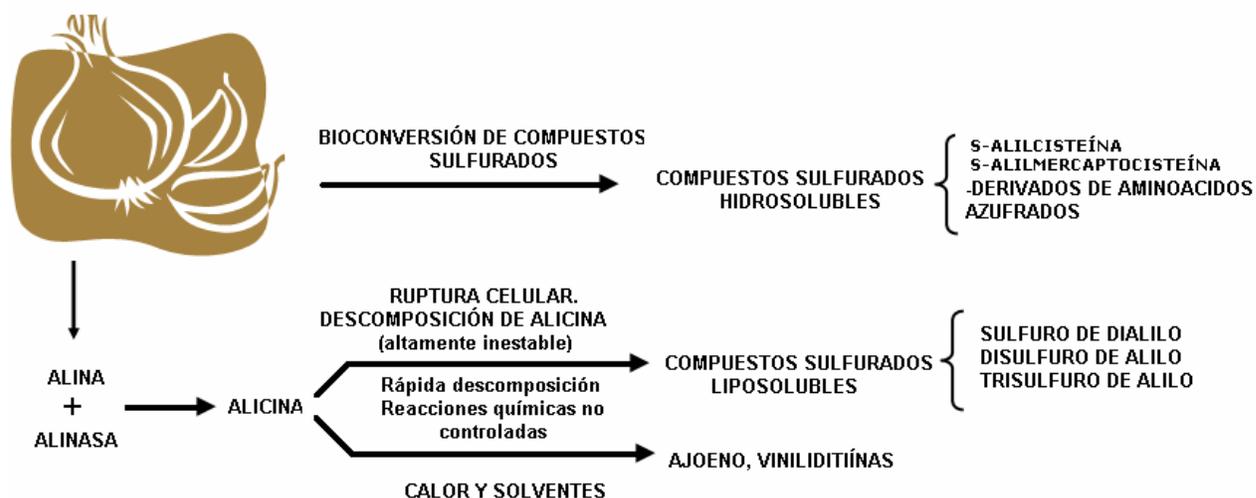
Tabla 1. Principales compuestos sulfurados presentes en el ajo fresco [6].

Compuesto	Estructura Química	Cantidad (mg/g)
<i>Sulfóxidos S-(+)-Alquil-L-cisteína</i>		
Alina		5-14
Metina (metiína)		0.5-2.0
Isoalina		0.2-1.2
Cicloalina		0.5-1.5
<i><math>\gamma</math>-L-glutamil-S-alilcisteínas</i>		
$\gamma$ -glutamil-S-trans-1-propenilcisteína		3-9
$\gamma$ -glutamil-S-alilcisteína		2-6
$\gamma$ -Glutamil-S-metilcisteína		0.1-0.4

La alina, la metiína y la isoalina son los principales compuestos que se encuentran en el diente de ajo. Cuando el ajo es cortado o machacado, estos compuestos son biotransformados por la acción de la alinasa (alliin lyase; EC

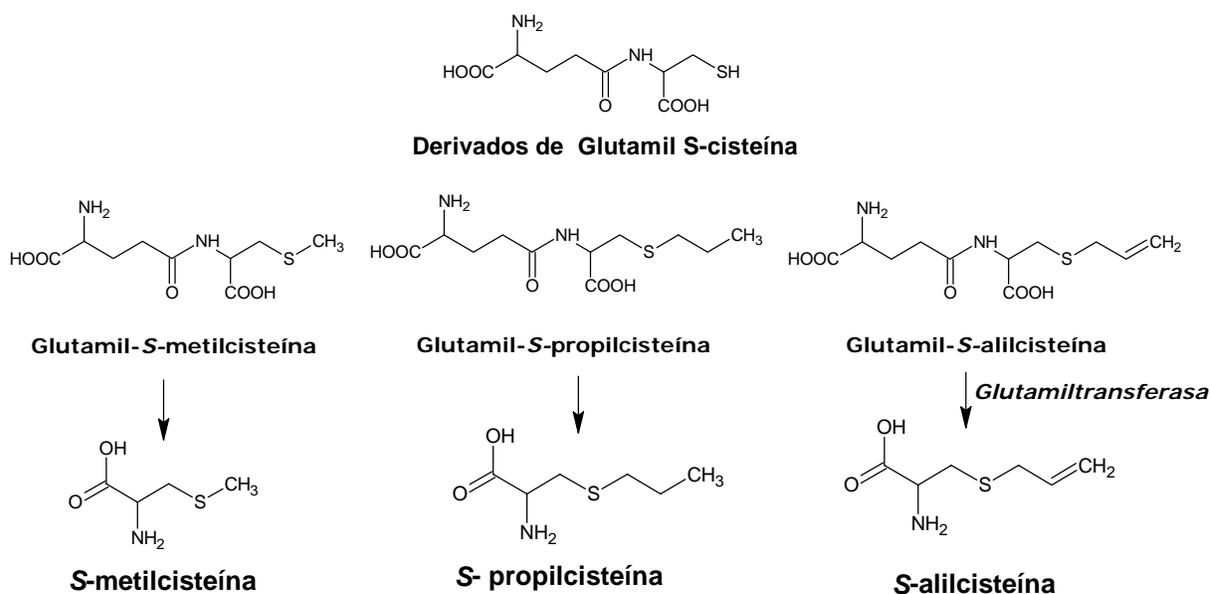


4.4.1.4), obteniéndose diferentes compuestos sulfurados liposolubles (Figura 2) [6-7].



**Figura 2.** Transformación de los compuestos sulfurados presentes en el ajo [8].

Por otro lado, las  $\gamma$ -glutamilcisteínas son bioconvertidas naturalmente en compuestos de menor peso molecular (Figura 3), que en algunas ocasiones son más estables, seguros y benéficos para la salud que los compuestos iniciales (ver más adelante) [8-10].



**Figura 3.** Transformación de algunas glutamylcisteínas en el diente de ajo fresco [6].



En el mercado existen diferentes preparaciones del ajo, sin embargo su efecto terapéutico así como su composición química, cambia significativamente de preparación a preparación (Tabla 2), esto depende del tratamiento físico o químico que se le da a los dientes de ajo [11].

**Tabla 2.** Principales compuestos sulfurados en algunas preparaciones de ajo [11].

<b>Homogenado de Ajo</b>	<b>Destilado de aceite a presión</b>
Alicina	Dialilsulfuro
Metilalil tiosulfínatos	Dialildisulfuro
L-glutamil-S-alilcisteína	Dialiltrisulfuro
<b>Polvo de ajo</b>	Dialiltetrasulfuro
Alina	Alilmetiltrisulfuro
<b>Extracto de ajo envejecido</b>	Alilmetildisulfuro
S-alilcisteína	Dimetiltrisulfuro
S-alilmercaptocisteína	<b>Aceite de Ajo</b>
	2-vinil-4-H-1,3 ditína
	3-vinil-4-H-1,3 ditína
	E-ajoeno
	Z-ajoeno



El extracto de ajo envejecido (EAE) es una preparación que resulta de la extracción etanólica del ajo fresco a temperatura ambiente, durante 20 meses en tanques de acero inoxidable [12]. El proceso de envejecimiento, transforma los compuestos irritantes del ajo en compuestos más estables y menos tóxicos (principalmente compuestos polares) [13]. Los compuestos mayoritarios en el EAE son: la *S*-alilcisteína (SAC) y la *S*-alilmercaptocisteína, a los que se les ha atribuido la potente actividad antioxidante del EAE (Tabla 3). Además, se ha demostrado que el EAE contiene pequeñas cantidades de compuestos antioxidantes como: derivados de aminoácidos alílicos, sulfuros de alilo liposolubles, compuestos fenólicos, alixina, *N*-fructosilglutamato, *N*-fructosilarginina, flavonoides, saponinas, selenio, entre otros [14,15].

*Tabla 3. Composición del extracto de ajo envejecido (EAE) <sup>a</sup> [9].*

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad (mg/g extracto)</b>
<i>Alina</i>	0.32±0.13
<i>Cicloalina</i>	0.34±0.08
<i>γ</i> -glutamil- <i>S</i> -alilcisteína	0.25±0.12
<i>S</i> -alilcisteína	0.62±0.07
<i>S</i> -1-propenilcisteína	0.37±0.04
<i>S</i> -alilmercaptocisteína	0.14±0.03
Ácido glutámico	1.20±0.20
Arginina	2.20±1.10

<sup>a</sup> Los datos son la media ± DS de 6 lotes.

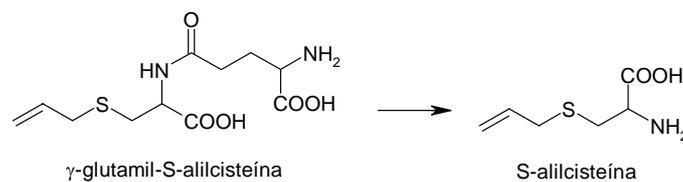
A pesar de que existen diferentes preparaciones de ajo, el EAE posee ciertas ventajas de uso con respecto a las otras debido a que: 1) no posee el olor característico de otras presentaciones [9]; 2) no muestra efectos tóxicos [16-17]; 3) tiene un alto contenido de antioxidantes [14]; 4) diferentes publicaciones científicas han demostrado su posible uso terapéutico en humanos [18-21]; y 5) es



un producto que se vende comúnmente en Estados Unidos, Japón y algunas partes de Europa como un suplemento alimenticio.

## 2. SAC, UN COMPUESTO CLAVE DEL EAE

El compuesto mayoritario del EAE es la SAC, la cual proviene de la descomposición de las  $\gamma$ -glutamilcisteínas (Figura 4). La SAC es un compuesto sulfurado, hidrosoluble, estable, de olor característico y su concentración en el EAE se incrementa durante el envejecimiento [13].



**Figura 4.** La  $\gamma$ -glutamil-S-alilcisteína es el precursor de la SAC.

Se han demostrado las propiedades antioxidantes de la SAC ya que:

- 1) *Atrapa radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO) in vitro [22,23];*
- 2) *Inhibe la lipoperoxidación (LPx) inducida por el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), en células endoteliales de pulmón [24];*
- 3) *Inhibe la oxidación de las lipoproteínas de bajo peso molecular, sugiriendo que puede proteger a las células endoteliales vasculares contra el daño causado por las lipoproteínas de bajo peso molecular oxidadas [25,26];*
- 4) *Inhibe la activación del factor nuclear kappa B inducida por el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y el  $H_2O_2$  [22,27];*
- 5) *Previene el daño histológico en el corazón e hígado de animales tratados con el anticancerígeno doxorubicina [28];*
- 6) *Previene el estrés oxidativo y la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa de manganeso, glutatión peróxidasa y glutatión reductasa, en un modelo de insuficiencia renal aguda [29]. Además, protege a las células LLC-*



- PK1 (línea de túbulo proximal renal) contra el daño inducido por el dicromato de potasio [30];*
- 7) Previene la formación de edema y el área de infarto isquémica en el cerebro de ratas, a través de la inhibición de la LPx [31,32]. Recientemente se reportó que la SAC atenúa el daño cerebral isquémico, debido a que atrapa peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) e inhibe la activación de la cinasa regulada por señales extracelulares [33];*
  - 8) Regula la producción de óxido nítrico, ya que inhibe la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible en macrófagos e incrementa la producción de óxido nítrico en células endoteliales, lo que puede contribuir a su efecto antiinflamatorio [34];*
  - 9) Protege contra la muerte celular inducida por el péptido  $\beta$  amiloide (péptido que induce la enfermedad de Alzheimer) [35,36]; previene el estrés oxidativo inducido por este péptido en el hipocampo y mejora el aprendizaje [35]; y bloquea la apoptosis inducida por el péptido ya que inhibe la actividad de la caspasa-3 en células PC12 [37,38];*
  - 10) Disminuye la LPx e incrementa los niveles de antioxidantes en un modelo de hepatocarcinogénesis [39] así mismo, previene el daño hepático inducido por el acetaminofen [40];*
  - 11) Previene la neurotoxicidad y el daño oxidativo inducidos por el ácido quinolínico (neurotoxina que induce la enfermedad de Huntington), debido a que atrapa radicales libres, disminuye el estrés oxidativo y preserva la actividad de la superóxido dismutasa de cobre y zinc [41];*
  - 12) La administración diaria de SAC durante 4 semanas en ratones, incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y glutatión peroxidasa y disminuye la LPx en el hígado y el riñón [42];*
  - 13) Muestra actividad neurotrófica ya que promueve la ramificación axonal en cultivos neuronales [43];*



- 14) *Previene la hiperactividad inducida por el ácido 3-nitropropiónico (neurotoxina) en ratas [41];*
- 15) *Disminuye el daño renal isquémico debido a que previene el incremento en los niveles de LPx [44];*
- 16) *Disminuye la hipertensión y el daño renal en ratas sometidas a nefrectomía 5/6. El efecto antihipertensivo se asoció con la reducción en la expresión renal de la NADPH oxidasa y con la modulación de la producción de óxido nítrico (vasodilatador). El efecto sobre el daño renal se asoció con las propiedades antioxidantes de la SAC, ya que previno el incremento en los niveles de la 3-nitrotirosina y la disminución de la actividad de la superóxido dismutasa [45].*

*Por otro lado, se han desarrollado algunos estudios sobre la farmacocinética de la SAC [46,47] y se ha encontrado que después de su ingesta oral, ésta se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal y se detecta en el plasma y algunos tejidos (hígado, riñón) hasta 8 h después [47]. La biodisponibilidad de la SAC es de 100% en ratones, 98.2% en ratas y 87.2% en perros. La N-acetil-SAC se ha identificado como un metabolito de la SAC, sugiriendo que la SAC podría ser transformada por la N-acetil-transferasa.*



Algunas características de la SAC se resumen en la tabla 4.

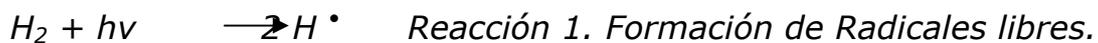
**Tabla 4. Características de la SAC [48].**

<b>Solubilidad (1 g de SAC a 20°C)</b>				<b>Toxicidad</b>				
<b>Solvente</b>		<b>Volumen (mL)</b>		<b>Vía</b>	<b>Sexo</b>	<b>DL<sub>50</sub> (g/Kg)</b>		
						<b>Ratón</b>	<b>Rata</b>	
Agua		14.7		Oral	Macho	8.89	10.9	
HCl 10%		5.0				Hembra	9.39	9.50
NaOH 0.1 N		11.0			Macho	Hembra	6.91	3.34
Metanol		1053					Hembra	3.65
Etanol		>10000			Intravenosa	Macho	6.91	3.34
Acetonitrilo		>10000					Hembra	3.65
Acetato de Etilo		>10000		<i>DL<sub>50</sub>: Dosis Letal Media</i>				
Amortiguador	pH 2.41	13.1						
	pH 3.65	14.2						
	pH 5.84	14.0						
	pH 8.29	13.4						
	pH 9.68	13.0						
	pH 10.47	12.5						
<b>Punto de Fusión</b>		223.0-223.6°C		<b>Hidroscopicidad</b>				
<b>Constante de Disociación</b>		pK <sub>1</sub> = 2.2 pK <sub>2</sub> = 9.1		<b>Humedad (%)</b>	<b>Almacenamiento (días)</b>	<b>Incremento de peso (%)</b>		
<b>Punto Isoeléctrico</b>		5.6		93	7	0.03		
<b>Rotación Óptica</b>		+ 4.41			14	0.09		
					28	0.17		
<b>Estabilidad</b>				81	7	0.03		
Almacenamiento	Contenido (%)				14	0.07		
		Luz UV	Luz Fluorescente		28	0.07		
Cristal	muestra	101.4	99.2	71	7	0.02		
	Control en oscuridad	99.9	98.5		14	0.06		
Agua	muestra	99.5	98		28	0.13		
	Control en oscuridad	100.2	100	51	7	0.02		
HCl 1 N	muestra	99.6	102.3		14	0.05		
	Control en oscuridad	99.9	98.5		28	0.08		
NaOH 0.1 N	muestra	100.3	100.4					
	Control en oscuridad	99.2	99.9					



### 3. RADICALES LIBRES

El concepto químico de radical libre (RL) estaba bien desarrollado en 1954, cuando Gerschman postuló a las ERO como responsables de la toxicidad del oxígeno ( $O_2$ ) y la radiación. Los estudios clásicos de Gomberg (1900) y de Paneth (1923) habían mostrado la existencia en fase gaseosa de arreglos moleculares relativamente estables que contenían un electrón desapareado, producto de rupturas homolíticas por acción de la luz, a los que se denominaron RL (Reacción 1). Rice y Herzfeld (1934) clasificaron a las reacciones que involucran radicales libres en reacciones de iniciación, propagación, inhibición y terminación. Actualmente, esta nomenclatura se utiliza en bioquímica para nombrar a las reacciones de propagación y de terminación en la LPx (ver más adelante) y en las reacciones con antioxidantes [Revisado en 49].



El  $O_2$  es un RL debido a que en su molécula presenta 2 electrones desapareados, lo que lo hace un potente oxidante. Si bien es cierto que el  $O_2$  es indispensable para los organismos aerobios (pues es el aceptor final de los electrones en la cadena respiratoria), también es cierto que a altas concentraciones o bajo ciertas condiciones, llega a ser tóxico. Existen diferentes especies radicales y no radicales del  $O_2$ , que en general se conocen como ERO (Tabla 5).

Tabla 5. Especies reactivas de oxígeno (ERO) [51].

<b>Radicales</b>	<b>No radicales</b>
Superóxido, $O_2^{\bullet-}$	Peróxido de hidrógeno, $H_2O_2$
Hidroxilo, $\bullet OH$	Ozono, $O_3$
Singulete, $O_2^1 \Sigma g^+$	Singulete, $O_2^1 \Delta g$

Además de las ERO, también tienen importancia biológica las especies reactivas derivadas del nitrógeno (ERN) como: el óxido nítrico ( $\bullet NO$ ), el dióxido de nitrógeno ( $\bullet NO_2$ ), el ácido nitroso ( $HNO_2$ ),



el catión nitronio ( $\text{NO}_2^+$ ), el catión nitroxilo ( $\text{NO}^+$ ), el anión nitroxilo ( $\text{NO}^-$ ), el tetraóxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ), el trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), los alquilperoxinitritos ( $\text{RONOO}$ ), el ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ); éste último, potente agente oxidante que en presencia de  $\text{CO}_2$  puede formar el anión nitrosoperoxicarboxilato, que se descompone a  $\text{CO}_2$  y  $\text{NO}_3^-$  (65-70%) o a  $\bullet\text{NO}_2$  y  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  (30-35%) [52-54].

#### 4. ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO

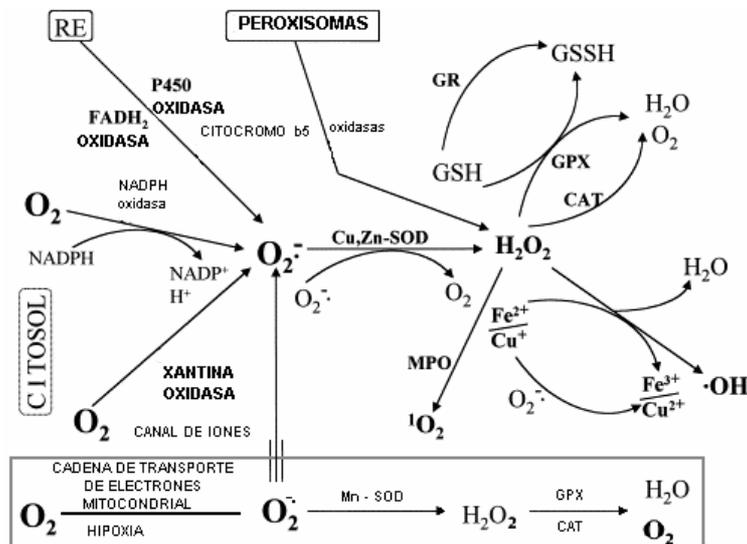
En condiciones normales existe un balance entre las condiciones oxidantes y las defensas antioxidantes; sin embargo, este equilibrio puede alterarse debido a: 1) un aumento en la producción de las ERO y las ERN, 2) una disminución en los sistemas antioxidantes o 3) una combinación de ambos. Cuando este equilibrio se rompe se denomina estrés oxidativo y nitrosativo. En esta situación se induce daño en las macromoléculas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos) por el rompimiento o la modificación de su estructura, resultando en la alteración de la función o incluso, la muerte de la célula.

El estudio del estrés oxidativo y nitrosativo ha cobrado considerable importancia debido a las consecuencias que genera en la salud, ya que se ha asociado con el proceso de envejecimiento, el daño ocasionado por la isquemia/reperfusión y a una gran diversidad de estados patológicos como la enfermedad de Alzheimer, Huntington, Parkinson, la artritis reumatoide, la hipertensión, la carcinogénesis, entre otros. También se ha observado que diversos factores ambientales, como los contaminantes en el aire y la radiación ionizante pueden favorecer el desequilibrio oxidante/antioxidante [54].

Debido al potencial efecto destructivo de las ERO y las ERN, la célula cuenta con sistemas de defensa para evitar el daño y sus posibles implicaciones. Estos sistemas de detoxificación comprenden



enzimas y/o atrapadores no enzimáticos presentes en las células (Figura 5) [55,56].

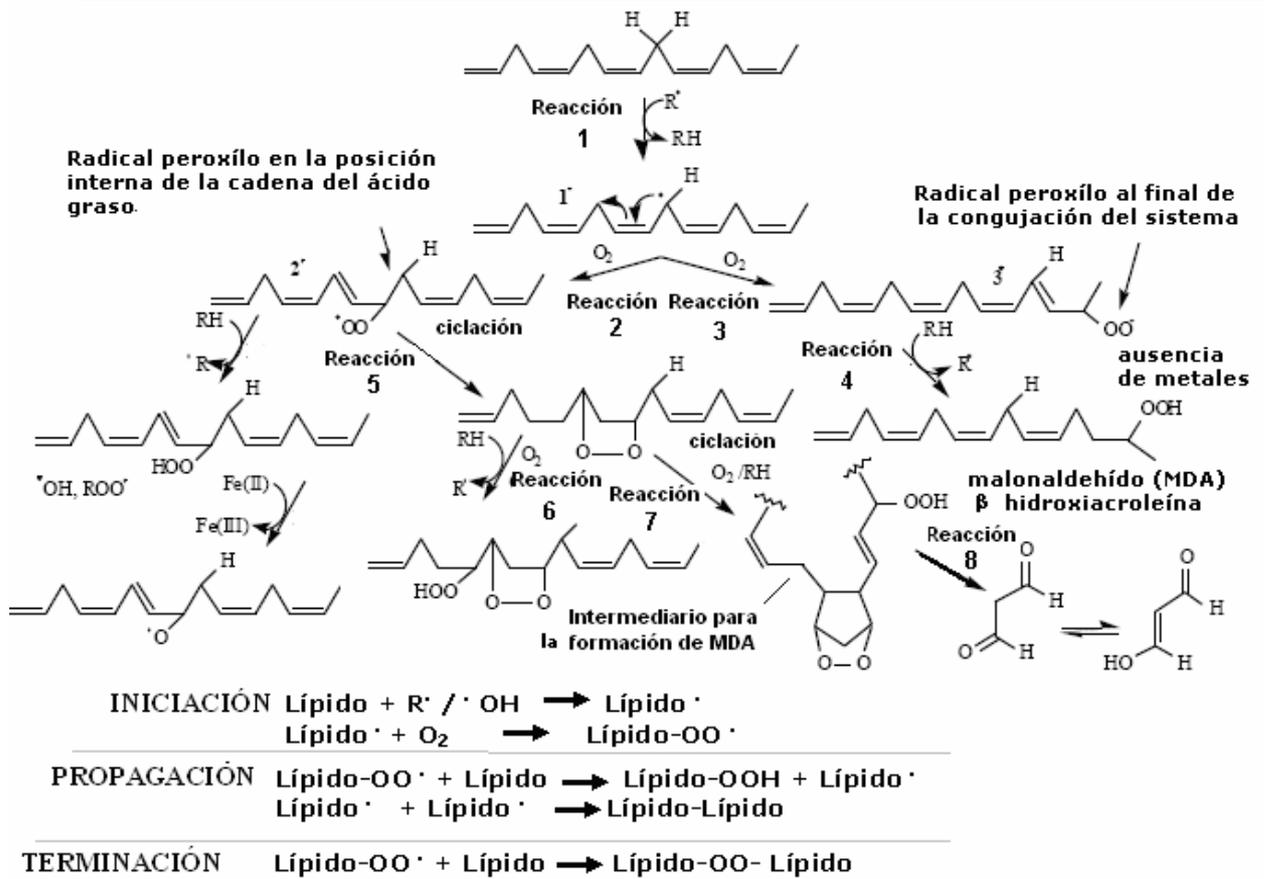


**Figura 5.** Fuentes de ERO y mecanismos de defensa [54]. RE: retículo endoplásmico, CuZnSOD: superóxido dismutasa de cobre y zinc, MnSOD: superóxido dismutasa de manganeso, GPx: glutatión peroxidasa, CAT: catalasa, GR: glutatión reductasa, MPO: mieloperoxidasa, GSH: glutatión, GSSH: disulfuro de glutatión.

Dentro de los atrapadores de radicales libres no enzimáticos se encuentran el glutatión, las vitaminas E y C, la bilirrubina, el ácido úrico, entre otros [55]. Mientras que las principales enzimas antioxidantes son: la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa [52]), aunque existen otras como las peroxiredoxinas, que son una familia de peroxidasa recientemente descubiertas y que están altamente conservadas en eucariontes y en procariontes [57].

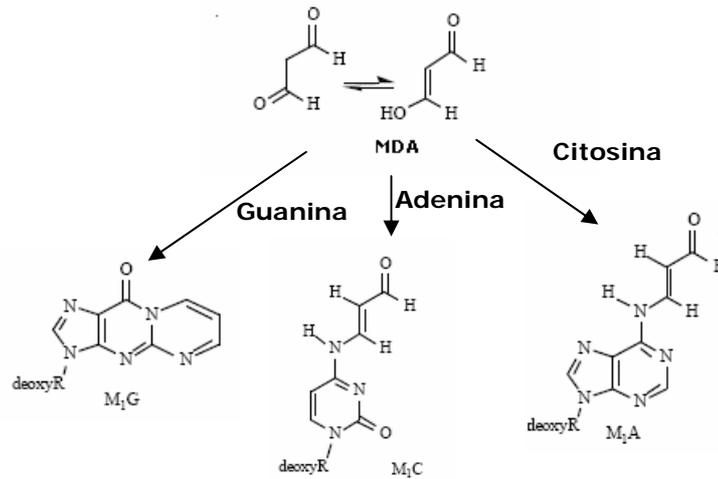
## 5. LIPOPEROXIDACIÓN (LPx)

La LPx es un proceso autocatalítico que está involucrado en la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas y que resulta en la alteración de la permeabilidad de éstas. Como resultado de la LPx se obtienen derivados de aldehídos simples, aldehídos hidroxilados, cetonas, alquenos, hidrocarburos, entre otros (Figura 6). Bucher y col. sugieren que la LPx ocurre vía la producción de RL promovido por el hierro [54].

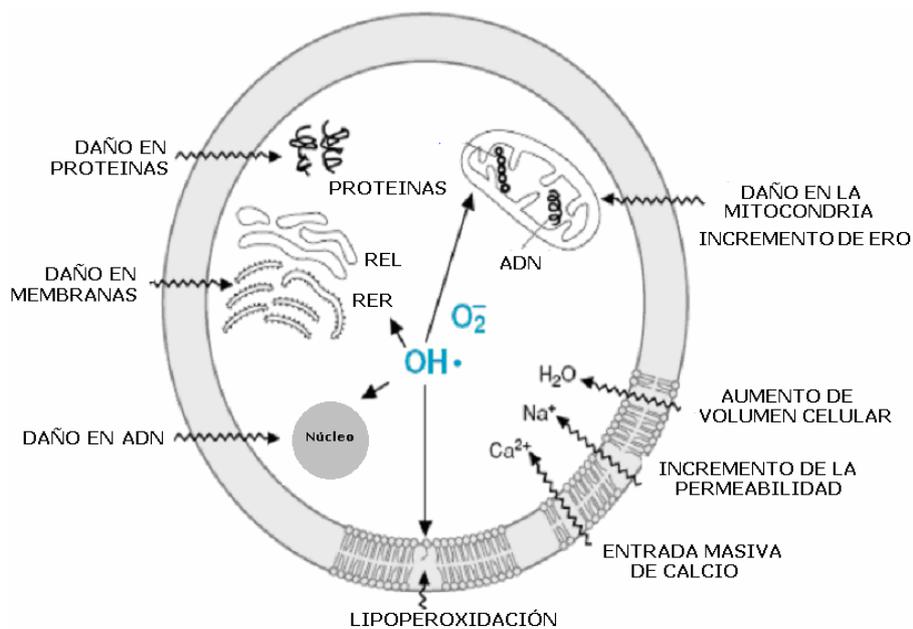


**Figura 6.** El grupo metileno de los ácidos grasos poliinsaturados es altamente susceptible a la oxidación. Los átomos de hidrógeno después de la interacción con un radical libre ( $\text{R}'$ ), son removidos (reacción 1). Los radicales formados en los carbonos reaccionan con el  $\text{O}_2$  para formar el radical peroxilo ( $\text{ROO} \cdot$ ) (reacción 2 y 3). El  $\text{ROO} \cdot$  localizado al final del sistema conjugado, es reducido a hidropéroxido con relativa estabilidad en ausencia de metales (reacción 4). El  $\text{ROO} \cdot$  localizado en la cadena interna del ácido graso puede reaccionar para formar un peróxido cíclico (reacción 5), el cual puede reducirse a un hidropéroxido (reacción 6) o por la reacción 7 puede formar peróxidos bicíclicos. El compuesto 7 es un intermediario en la producción de malondialdehído (MDA) (reacción 8).

Los productos principales de la LPx pueden reaccionar con las membranas celulares, el ADN (Figura 7) o las proteínas; generando epóxidos que rápidamente reaccionan con centros nucleofílicos en la síntesis de proteínas, toxicidad, sobreproducción de ERO, entre otros (Figura a célula causando daños tales como: alteración en sí 8) [54].



**Figura 7.** El malondialdehído (MDA) puede reaccionar con la guanina, la adenina y la citosina de los ácidos nucleicos [54].



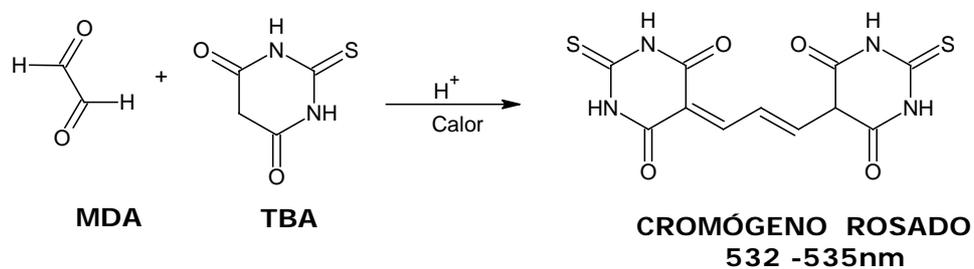
**Figura 8.** Daño causado por las ERO en la célula.  
ADN: ácido desoxirribonucleico, REL: Retículo endoplásmico liso, RER: retículo endoplásmico rugoso.

*Como indicadores bioquímicos del daño oxidativo, normalmente se determinan los productos finales de la reacción de oxidación que ocurre entre los RL y las biomoléculas. Dentro de estos productos se*



encuentran el malondialdehído (MDA) o las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que son los productos finales del daño oxidativo a los lípidos; la 8-HO-deoxiguanosina, que es el principal producto de la oxidación de los ácidos nucleicos; y los grupos carbonilo y la nitración de la tirosina, que son los productos de la oxidación y la nitración de las proteínas, respectivamente [54,56].

Determinar los niveles de MDA es un excelente parámetro para evidenciar la oxidación no enzimática de los lípidos de las membranas celulares. A pesar de que existen numerosos métodos para determinar los niveles de MDA, son los métodos indirectos los que más se usan. El método de TBARS es el más utilizado de todos los métodos indirectos y se basa en la capacidad de reacción de una molécula de MDA con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (Figura 9) para formar un cromógeno rosado que es fácilmente cuantificable por espectrofotometría fluorescente, ya que presenta un máximo de absorción entre 532-535 nm [58,59].



**Figura 9.** Reacción entre el malondialdehído (MDA) y el ácido tiobarbitúrico (TBA) en el ensayo de LPx.



### III. JUSTIFICACIÓN

*Debido al gran número de patologías relacionadas con las ERO y las ERN, diversos compuestos con propiedades antioxidantes se deben evaluar como posibles agentes terapéuticos o como auxiliares en el tratamiento de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo y nitrosativo. Ejemplo de estos compuestos, son aquellos que han mostrado un efecto benéfico para la salud, como los derivados de plantas y/o vegetales.*

*Para que un compuesto antioxidante pueda ser empleado con éxito como agente terapéutico o como auxiliar en algún padecimiento asociado con el estrés oxidativo y nitrosativo, es indispensable considerar el tipo de radical libre que se genera en el padecimiento, su origen y el modo de acción del compuesto antioxidante. De esta manera se puede elegir el tipo de antioxidante a administrar, ya sea hidrofílico, lipofílico y/o quelante.*

*En este contexto, actualmente existe un gran interés en la SAC (el componente principal del EAE), debido al potente efecto farmacológico que ha mostrado como antioxidante en diferentes modelos experimentales de enfermedades donde el estrés oxidativo y nitrosativo está involucrado en el mecanismo de inducción del daño (insuficiencia renal aguda, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, isquemia renal y cerebral, entre otros).*

*Sin embargo, debido al prolongado tiempo de obtención (20 meses) de la SAC, su baja distribución natural (0.62 mg/g de EAE) y su potencial terapéutico, resulta trascendental su obtención por síntesis orgánica. En la literatura sólo existe un reporte sobre la síntesis orgánica de la SAC, pero el método propuesto requiere de condiciones extremas (atmósfera de nitrógeno, presión elevada) para poder llevarla a cabo. Además, en ese estudio no se reporta la caracterización del compuesto por espectroscopia de masas, lo que no asegura que el compuesto obtenido sea la SAC, así como tampoco se menciona el método de purificación empleado [60]. Se ha reportado la preparación sintética de derivados de L-cisteína, a través de la reacción entre*



el clorhidrato de L-cisteína y el bromuro correspondiente en presencia de sodio metálico [61], reacción que fue empleada en este trabajo.

Por otra parte, se ha reportado que la presencia del grupo tioalilo en la SAC, es de vital importancia para promover la ramificación axonal en cultivos de neuronas, ya que cuando este grupo se sustituye la actividad neurotrófica se pierde [43]. En este contexto, no existen reportes en la literatura en los que se evalúe que componente(s) de la estructura de la SAC es (son) responsable(s) de la actividad antioxidante que se ha reportado para este compuesto. Por ello, en este trabajo se evaluó la capacidad de la SAC para atrapar diferentes especies radicales y se exploró si el grupo alilo es vital para esta propiedad. Esto se logró a través de la obtención de compuestos en los que el grupo alilo se sustituyó por un grupo propilo y un grupo bencilo.

En resumen, en este proyecto se propone una síntesis orgánica para la obtención de la SAC en el laboratorio, a través de la reacción entre el clorhidrato de L-cisteína y el bromuro de alilo. Se reportan las propiedades físicas y los datos espectroscópicos y cromatográficos con que se identificó al compuesto obtenido. Además, se evaluó la capacidad antioxidante del compuesto obtenido frente a diferentes especies radicales y se evaluó si el grupo alilo es importante para atrapar estas especies radicales.



---

#### IV. OBJETIVO GENERAL

1. *Sintetizar derivados de L-cisteína*
2. *Evaluar las propiedades antioxidantes de los derivados de L-cisteína*
3. *Evaluar la importancia del grupo alilo en las propiedades antioxidantes de los derivados de L-cisteína*

#### V. OBJETIVOS PARTICULARES

1. *Sintetizar S-alilcisteína (SAC) a partir de cloruro de L-cisteína monohidratada en presencia de bromuro de alilo.*
2. *Síntetizar S-bencilcisteína (SBC) a partir de cloruro de L-cisteína monohidratada en presencia de cloruro de bencilo.*
3. *Síntetizar S-propilcisteína (SPC) a partir de cloruro de L-cisteína monohidratada en presencia de bromuro de propilo.*
4. *Caracterizar la estructura química mediante métodos espectroscópicos y espectrofotométricos de los compuestos SAC, SBC y SPC.*
5. *Evaluar la capacidad atrapadora de la SAC, la SBC y la SPC, en sistemas que generan especies como  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ , HOCl, ONOO<sup>-</sup> y  $\cdot OH$ ,*
6. *Evaluar el efecto antioxidante de la SAC, la SBC y la SPC en un ensayo de lipoperoxidación.*



---

## VI. HIPÓTESIS

*La SAC es un compuesto que posee un grupo tioalilo en su estructura similar a otros compuestos antioxidantes presentes en el ajo, lo que sugiere que este grupo grupo es vital para dicha actividad. Por ello es posible que la modificación del grupo alilo cambie la actividad antioxidante de la SAC*



---

## VII. MATERIAL Y METODOLOGÍA

### A. REACTIVOS

*El clorhidrato de L-cisteína monohidratada, el bromuro de alilo, el oftalaldehído, el 2-mercaptoetanol, el yodo, el naranja xilenol, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el hidroxitolueno butilado, el piruvato de sodio (PYR), la dimetilnitrosoanilina, la histidina, el ácido lipóico (ALP), el ácido 5,5-ditio-2-nitrobenzóico, el borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), la diclorodihidrofluoresceína, el nitrato de potasio (KNO<sub>2</sub>), el óxido de manganeso (MnO<sub>2</sub>), el ácido dietilaminopentanóico, la albúmina sérica bovina, el ácido ascórbico, la acrilamida, la bisacrilamida, el tris-HCl, el persulfato de amonio, el glicerol, la glicina, la tetrametiletilendiamina, el dodecilsulfato de sodio (SDS), el azul de Coomassie, el azul de bromofenol; el ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) y el ácido tiobarbitúrico (TBA) fueron de Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).*

*El metanol (MeOH), el etanol (EtOH), el propanol, el acetonitrilo (ACN) grado HPLC y grado analítico fueron de Mallinckrodt (México, DF).*

*El cloruro de bencilo, el bromuro de propilo, el fosfato de sodio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), el hipoclorito de sodio (NaOCl), el ácido tricloroacético, el cloruro de sodio (NaCl), el carbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), el cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), el sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>), el sulfato ferroso amoniacal [Fe (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>], el sodio metálico, el ácido acético glacial, el hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH), el ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), el ácido clorhídrico (HCl) y el hidróxido de sodio (NaOH) fueron de JT Baker (México, DF).*



## B. EQUIPO

*Para la evaporación de los disolventes se empleó un evaporador rotatorio marca Büchi modelo RE 111.*

*El punto de fusión (Pf) se determinó en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.*

*Los análisis espectroscópicos se realizaron en la USAI, Facultad de Química, UNAM:*

- 1. Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un aparato Nicolet FT5SX en pastilla de KBr. Las unidades se reportan en  $\text{cm}^{-1}$ .*
- 2. Los espectros de Resonancia Magnética Protónica Nuclear (RMN  $^1\text{H}$ ) se realizaron en un aparato Varian VxR-300S (400 MHz). Los desplazamientos químicos están dados en ppm ( $\delta$ ) y las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hertz (Hz). Se utilizó como disolvente  $\text{D}_2\text{O}$  y su señal como referencia interna.*
- 3. Los espectros de espectrometría de masas (EM) se determinaron por impacto electrónico (IE) en un espectrómetro JEOL JMS-AX505HA. El ión molecular se indica como  $M^+$ . La nomenclatura se indica como  $m/z$  = masa/carga con su respectiva abundancia relativa.*

*La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a UV, se realizó en la Facultad de Medicina, en la Torre de investigación, UNAM.*

*Las lecturas de absorbancia se obtuvieron en un espectro Beckman DU 530. Las muestras se separaron en una centrifuga refrigerada eppendorf 5417R.*

*En el caso de la SAC, los resultados obtenidos se compararon con los de un estándar donado por Wakunaga of America, Co., LTD (Misión Viejo, CA, USA).*



### 3. METODOLOGÍA

#### A. PARTE QUÍMICA

##### a. Síntesis orgánica de la SAC, la SBC y la SPC

*El material de vidrio empleado se colocó 24 h antes de la síntesis en una estufa a 110°C. En un matraz de bola de 250 mL se colocaron 30 mmoles de cloruro de L-cisteína en 90 mL de EtOH absoluto con agitación constante. Se adicionaron 0.11 moles de sodio metálico durante 30 min. Cuando el sodio se disolvió completamente, se adicionaron 31 mmoles de bromuro de alilo (para la SAC), 23 mmoles de cloruro de bencilo (para la SBC) y 30 mmoles de bromuro de propilo (para la SPC), y se dejó reaccionar durante 1 h. Se adicionó agua fría hasta obtener una solución. El exceso de EtOH se evaporó y se precipitó cada uno de los compuestos con ácido acético concentrado. El precipitado se filtró y se lavó con EtOH frío.*

##### b. Identificación de la SAC, la SBC y la SPC

*La identificación de los productos fue por Cromatografía en Capa Fina analítica siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice Aldrich con indicador de UV y espesor de 0.2 mm. El sistema de elusión empleado fue 2-propanol-NH<sub>4</sub>OH en una proporción de 95:5, las muestras de SAC, SBC y SPC se colocaron disueltas en MeOH. Las bandas se visualizaron con vapores de yodo para determinar el factor de desplazamiento.*

##### c. Determinación de pureza de la SAC, la SBC y la SPC

*La determinación de la pureza se realizó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Para ello, se utilizó un cromatógrafo Waters y una columna analítica, Phenomenex C 18 de 4.5 mm de diámetro interno, 250 mm de largo y un tamaño de partícula de 5 micras. La identificación se realizó empleando un detector Dual de UV Waters 2487 a una longitud de onda de 330 nm. El flujo de trabajo fue de 0.8 mL/min en fase*



isocrática de fosfatos 50 mM, pH 6.5-ACN-MeOH en una proporción de 50:28:22 [46]. Los compuestos evaluados se derivatizaron con o-ftaldehído en presencia de 2-mercaptoetanol en amortiguador de fosfatos 0.05 M, pH 9.5 y los datos se procesaron con el programa Epower.

## B. EVALUACIÓN IN VITRO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LA SAC, LA SBC y LA SPC

### a) Ensayo de actividad atrapadora para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxida al ión ferroso (Fe<sup>2+</sup>) a la forma férrica (Fe<sup>3+</sup>) la cual se une al naranja de xilenol formando un complejo colorido que absorbe a 560 nm. Por ello, para conocer la capacidad antioxidante de un compuesto, es necesario incubar a éste en una concentración conocida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el ensayo.

Se preparó la solución de FOX mezclando 9 partes de hidroxitolueno butilado 4 mM con 1 parte de naranja de xilenol 1 mM/Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 2.56 mM. En un tubo se colocaron 10 µL de MeOH grado HPLC, 90 µL de SAC, SBC o SPC a las diferentes concentraciones (10-125 mM), 900 µL de la solución de FOX y 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM. Se incubaron 30 min, se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 560 nm contra una curva patrón [62,63]. Se utilizó piruvato (PYR) como estándar para determinar la capacidad atrapadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### b) Ensayo de actividad atrapadora para <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

El <sup>1</sup>O<sub>2</sub> se generó a partir de NaOCl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [64]. En un tubo se colocó la siguiente mezcla de reacción: 750 µL de amortiguador de fosfatos 45 mM pH 7.1, 50 µL de histidina 10 mM, 50 µL de NaOCl 10 mM, 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM y 50 µL de cada uno de los compuestos evaluados a las diferentes concentraciones (0.25-4 mM). A esta mezcla se le adicionaron 50 µL de dimetilnitrosoanilina 1 mM en agitación constante y se leyó la absorbancia a 440 nm (tiempo cero). Posteriormente, se incubaron a 30°C



durante 40 min y se determinó nuevamente la absorbancia. La actividad atrapadora se obtuvo de la diferencia de la absorbancia al tiempo cero y la obtenida a los 40 min. Se utilizó al ácido lipóico (ALP) como estándar.

c) Ensayo de actividad atrapadora para HOCl

Se determinó la capacidad de cada compuesto para inhibir la oxidación de ácido 5,5-ditio-2-nitrobenzóico causada por el HOCl [65]. El HOCl se genera inmediatamente después de ajustar el pH a 6.2 con  $H_2SO_4$  0.6 M, de una solución de NaOCl al 1%. La concentración del HOCl se determinó usando su coeficiente de extinción molar ( $100 M^{-1}cm^{-1}$ ). El ácido 5,5-ditio-2-nitrobenzóico se preparó como sigue: a una solución de  $NaBH_4$  50 mM, se le añadió una solución de 1 mM en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.6 que contenía EDTA 5 mM. La mezcla anterior se incubó a 30°C durante 30 min y la concentración del ácido 5,5-ditio-2-nitrobenzóico se determinó a 412 nm usando su coeficiente de extinción molar ( $13,600 M^{-1}cm^{-1}$ ). El ensayo de la actividad atrapadora se muestra en la tabla 6:

**Tabla 6.** Cantidades empleadas en el ensayo de HOCl.

	Tubo 1 Blanco del 100%	Tubo 2 100%	Tubo 3 Blanco del problema	Tubo 4 Problema
ácido tio-2- nitrobenzóico 70 $\mu M$	400 $\mu L$	400 $\mu L$	400 $\mu L$	400 $\mu L$
A. Fosfatos 50 mM, pH 6.6	500 $\mu L$	---	500 $\mu L$	---
Agua	100 $\mu L$	100 $\mu L$	---	----
Muestra	---	---	100 $\mu L$	100 $\mu L$
HOCl 25 $\mu M$	---	500 $\mu L$	---	500 $\mu L$

Los tubos se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 412 nm. El porcentaje de inhibición se obtuvo como se muestra a continuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{ABS Tubo4} - \text{ABS Tubo3}}{\text{ABS Tubo2} - \text{ABS Tubo1}} \times 100$$



d) Ensayo de actividad atrapadora para  $\text{ONOO}^-$

*En este ensayo se determina la capacidad de un compuesto para inhibir la formación de diclorofluoresceína a partir de diclorodihidrofluoresceína inducida por el  $\text{ONOO}^-$ . El  $\text{ONOO}^-$  se sintetizó de la siguiente manera: a 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.7 M (en HCl 0.6 M) se le adicionaron 5 mL de  $\text{KNO}_2$  0.6 M en hielo por un segundo, la reacción se detuvo con 5 mL de NaOH 1.2 M fría. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  residual se removió usando una columna con  $\text{MnO}_2$  prelavada con NaOH 1.2 M. La mezcla se recolectó en un tubo y se guardó a  $-20^\circ\text{C}$ . La capa superior amarilla se recolectó y se guardó a  $-40^\circ\text{C}$  y se determinó la concentración  $\text{ONOO}^-$  a 302 nm usando su coeficiente de extinción molar ( $1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [66].*

*Se mezclaron durante 2 seg: 950  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.7 M, 50  $\mu\text{L}$  de cada compuesto, 20  $\mu\text{L}$  de ácido dietilaminopentanóico 1 mM, 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{ONOO}^-$  y 50  $\mu\text{L}$  de diclorodihidrofluoresceína. Se determinó la absorbancia cada 3 min. El tubo con la mezcla de reacción y sin muestra se consideró como el 0% de capacidad de atrapar dicho radical. La actividad atrapadora de esta especie se monitoreó por la formación de diclorofluoresceína a 500 nm usando su coeficiente de extinción molar ( $59500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).*

e) Ensayo de actividad atrapadora para  $\cdot\text{OH}$

*La actividad de atrapar  $\cdot\text{OH}$  de la SAC, la SBC y la SPC se determinó por su capacidad de inhibir la oxidación de la albúmina inducida por este radical.*

*Se disolvieron 100 mg de albúmina en una solución que contenía ácido ascórbico 1.6 mM, EDTA 0.8 mM y  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  0.8 mM en amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7.4. En un tubo se colocaron 250  $\mu\text{L}$  de la solución de albúmina, 250  $\mu\text{L}$  de la solución que contenía ácido ascórbico 1.6 mM, EDTA 0.8 mM y  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  0.8 mM, y 15  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2%. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 1 h, se les adicionó 250  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 20% y se centrifugaron a 5000 rpm por 30 min a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 M. Para determinar el daño oxidativo*



en la albúmina inducido por el  $\cdot\text{OH}$ , las muestras, se sometieron a una electroforesis desnaturalizante discontinua. Para ello, 40  $\mu\text{g}$  de albúmina se mezclaron 1:1 con un amortiguador de muestra (glicerol 10%, SDS 2%, Tris-HCl 25 mM pH 6.8, 2-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.1%) y se calentaron a ebullición por 1 min. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12% y se corrieron a 150 V por 2 h. Los geles, se tiñeron con azul de Coomassie por 1 h, se destiñeron con una solución de MeOH 40%/ácido acético 10% y se digitalizaron con un scanner para su análisis densitométrico. El área de cada banda se comparó contra un control positivo (con  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y un control negativo (sin  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [67].

### C. PARTE BIOLÓGICA

#### a) Ensayo de lipoperoxidación

El estudio se realizó en ratas hembras Wistar de 250-300 g de peso. Los animales se mantuvieron con libre acceso al alimento, así como en ciclos de luz y oscuridad de 12 h. Los animales se sacrificaron por decapitación para obtener el cerebro, el cual se homogenizó en una solución de HEPES (1:20 p/v) que contenía NaCl 0.1 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.001 M,  $\text{NaHCO}_3$  0.005 M,  $\text{CaCl}_2$  0.001 M, glucosa 0.006 M y HEPES 0.01 M.

Se colocaron 970  $\mu\text{L}$  del homogenado, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeSO}_4$  5 mM y 20  $\mu\text{L}$  de cada compuesto a evaluar. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente y en agitación por 1 h. De este tubo se tomaron 400  $\mu\text{L}$  del homogenado y se adicionaron a 800  $\mu\text{L}$  de una solución de TBA (0.375 g ácido tiobarbitúrico/15 g ácido tricloroacético/2.5 mL HCl). Se calentaron las muestras a ebullición (94°C) por 30 min y se centrifugaron a 6000 rpm por 15 min a 4°C. Se determinó la absorbancia a 525 nm [68]. Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico se expresaron en nmoles de MDA por gramo de tejido.



#### 4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

*Los datos se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (DS). La capacidad atrapadora se comparó contra el tubo de 0% de atrapamiento y se analizó por ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Dunnett. Los valores de  $CI_{50}$  de cada ensayo también se compararon por ANOVA seguido de una prueba de Bonferroni. En ambos casos, un valor de  $P < 0.05$  se considero estadísticamente diferente.*



## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## A. PARTE QUÍMICA

## a) SÍNTESIS ORGÁNICA Y CARACTERIZACIÓN DE LA SAC, LA SBC y LA SPC

## 1. SAC

A pesar de todas las bondades terapéuticas que presenta la SAC y su poca distribución natural, aun no se cuenta con una metodología estandarizada para su obtención. Debido a esto, en este trabajo se realizó una síntesis orgánica de la SAC que siguió una reacción de Sustitución Nucleofílica Bimolecular ( $S_N2$ ). La reacción se llevó a cabo al generar el anión del cloruro de L-cisteína en solución etanólica anhidra en presencia de sodio metálico, mismo que reaccionó con el electrófilo, el bromuro de alilo (Figura 10).

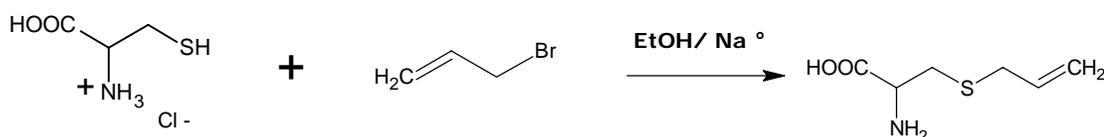


Figura 10. Síntesis de la SAC a partir del clorhidrato de L-cisteína y el bromuro de alilo.

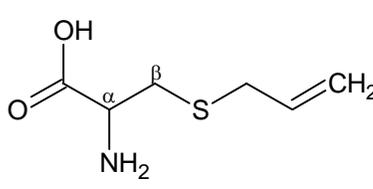
El compuesto se obtuvo como un sólido blanco cristalino, con un punto de fusión de 218-219°C (desc), una rotación específica de  $[\alpha]_D^{25} -35.79$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ) y un rendimiento de reacción del 70% (Tabla 7). El Pf reportado por Koderá y col [48] es de 222°C y la rotación específica de 4.4 grados. El Pf está de acuerdo con lo reportado; sin embargo, la diferencia que se observa en el valor de rotación específica podría radicar en el método empleado para su determinación, ya que Koderá y col no reportan que método siguieron.

En el espectro de IR (espectro 1) se observó a  $3428\text{ cm}^{-1}$  una banda ancha que pertenece al estiramiento de enlace N-H en una amina primaria, además de una banda de  $2975\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a vibraciones C-H



saturado, así como en  $1614\text{ cm}^{-1}$  banda característica del ácido carboxílico y en  $1585\text{ cm}^{-1}$  una banda intensa de vibración C=C (Tabla 7).

Tabla 7. Caracterización estructural de la SAC.

Compuesto	SAC
	<b>RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)</b> H-β <sub>1</sub> 2.94 (dd, J= 7.6,15, 1H) H-β <sub>2</sub> 3.05 (dd, J= 4.4, 14.8, 1H) -CH <sub>2</sub> -alílico 3.20 (d, J = 7.2, 2H) -H-α 3.89(dd, J = 8, 4.4, 1H) =CH <sub>2</sub> 5.23-5.17 (m,2H) -CH= 5.87-5.77 (m,1H)
<b>Punto de fusión</b>	218-219°C <b>IR (KBr, cm<sup>-1</sup>)</b>
<b>Rendimiento</b>	70% 3428 (-NH), 2977(-CH sat), 1616 (-COO-), 1584 (COO-), 926 (C-S-C)
<b>Rotación Específica</b>	-35.79 <b>EM (IE) m/z:</b>
<b>Factor de desplazamiento</b>	$[\alpha]_D^{25}[\text{H}_2\text{O}]$ 161 (M <sup>+</sup> , 8.18), 116(9.09), 89 (58.18), 88 (59.9), 87 (100), 74 (77.2), 45 (14.5), 41 (27.2), 39 (10), C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> SO <sub>2</sub> N

En el espectro de RMN<sup>1</sup>H (espectro 2), se observan a 2.94 ppm y 3.05 ppm dos señales doble de dobles, que corresponden a 2 protones, pertenecientes al grupo CH<sub>2</sub> adyacente al átomo de azufre (c-β); en 3.20 ppm se observa un doble que corresponde a los protones alílicos, así como en 3.89 ppm, doble de dobles que integra para 1 protón que corresponde al protón α al grupo carbonilo. Entre 5.23 y 5.17 ppm se observa una señal múltiple que integra para 2 protones pertenecientes a protones vinílicos terminales, también se observó como una señal múltiple de 5.87 a 5.77 ppm que integra para 1 protón que corresponde a un protón vinílico (Tabla 7).

En el espectro de EM (espectro 3), se observó al ión molecular de 161 m/z con una abundancia relativa del 8.18%, que corresponde al peso molecular de la SAC, así como al pico base de 87 m/z y un fragmento de 74 m/z con una abundancia del 77.2% (Tabla 7). El patrón de fragmentación sugerido para la SAC se muestra en la figura 11:

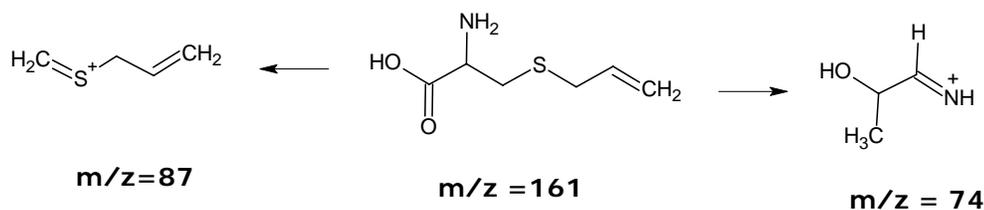


Figura 11. Patrón de fragmentación sugerido para la SAC.

## 2. SBC

Seguendo el mismo método de síntesis de la SAC, pero empleando cloruro de bencilo como electrófilo, se obtuvo la SBC (Figura 12), un compuesto blanco amorfo, con un punto de fusión de 215-216°C (desc.), con una rotación específica de  $[\alpha]_D^{25} +25.78$  (H<sub>2</sub>O) y un rendimiento de reacción del 60% (Tabla 8). Para la SBC, el Pf reportado es de 214°C (desc.) y una rotación específica de  $[\alpha]_D^{25} 19.8$  c=0.4, NaOH 1N [69], valores que concuerdan con los obtenidos.

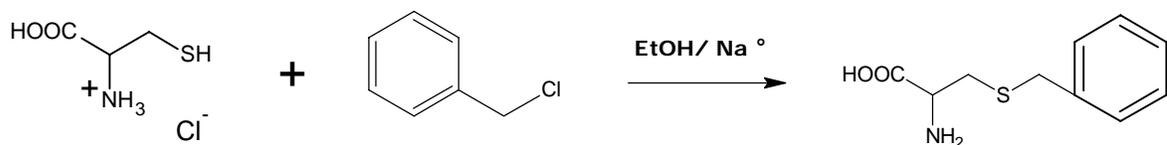
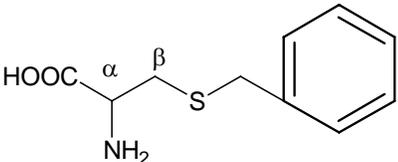


Figura 12. Síntesis de la SBC a partir del clorhidrato de L-cisteína y el cloruro de bencilo.

En el espectro de IR (espectro 4) se observa una banda de absorción a  $3448 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento del enlace N-H de una amina primaria, así como la absorción por estiramiento de enlace C-H insaturado a  $3158-3028 \text{ cm}^{-1}$ , bandas a  $1735 \text{ cm}^{-1}$  típica de vibraciones C=C de tipo aromático, a  $1619 \text{ cm}^{-1}$  banda de carbonilo, asignado a CO<sub>2</sub> y bandas intensas en  $1586 \text{ cm}^{-1}$ , así como bandas de sobre tonos por la inflexión de los enlaces C-H en  $695-710$  y  $767 \text{ cm}^{-1}$  (Tabla 8).



Tabla 8. Caracterización estructural de la SBC.

Compuesto	SBC	
	<b>RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)</b>	
	H <sub>2</sub> CS-	2.85 (dd, J = 14.6, 4.4, 2H)
	H <sub>β</sub>	2.77 (dd) J = 14.8, 7.6, 2H)
	H <sub>α</sub>	3.64 (dd, J = 7.6, 4.0, 1H)
	-aromático	7.27-7.181 (m, 4H)
<b>Punto de fusión</b>	215-216°C	<b>IR (KBr, cm<sup>-1</sup>)</b>
<b>Rendimiento</b>	60%	3448 (-NH), 2945-2616(-CH sat), 1586(-COO-), 1619 (COO-), 3158-3028 (-CH arilo) 695-767 (-CH arilo, fuera del plano)
<b>Rotación Específica</b>	+25.78 [α] <sub>D</sub> <sup>t</sup> [H <sub>2</sub> O]	<b>EM (IE) m/z:</b>
<b>Factor de desplazamiento</b>	0.67	211(M <sup>+</sup> , 2.0), 166(1.0), 138(8.0), 134(9.0), 124(8.0), 92(6.0), 74(5.0), 65(13), 91 (100), C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> SO <sub>2</sub> N

En el espectro de RMN<sup>1</sup>H (espectro 5) a 2.85 ppm y a 2.77 ppm se observan dos señales doble de doble que cada una integra para 1 protón que corresponden a los protones β al carbonilo. Se observa una señal doble de doble centrada a 3.65 ppm (J = 4, 7.6) que integra para un protón y corresponde al protón del grupo carbonilo; esta señal se encuentra traslapada con una señal simple que integra para 2 protones y corresponden al grupo metileno del anillo aromático bencílico. Los protones del anillo aromático se observan como una señal múltiple de 7.276-7.228 ppm (Tabla 8).

En el espectro de EM (espectro 6), se observa un pico base de 91 m/z y un ión molecular de 211 m/z con una abundancia relativa del 2.0% (Tabla 8). El patrón de fragmentación sugerido para la SBC se muestra en la figura 13:

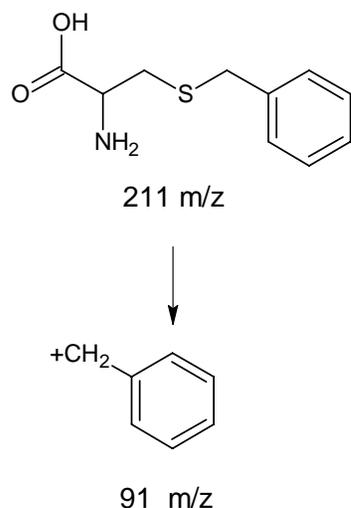


Figura 13. Patrón de fragmentación sugerido para la SBC.

### 3. SPC

Para la obtención de la SPC, se partió de cloruro de L-cisteína y de bromuro de propilo (Figura 14) bajo las condiciones mencionadas, dando como producto un compuesto blanco, cristalino, con un Pf de 205-206°C, una rotación específica de  $[\alpha]_D^{25} -11.67$  y un rendimiento del 70% (Tabla 9). El Pf que reportan Higuchi y col [70] para la SPC es de 205-206°C, que concuerda con el obtenido en este trabajo. No existen valores de rotación específica reportados para la SPC.

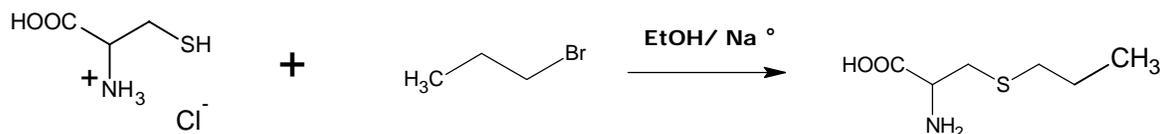


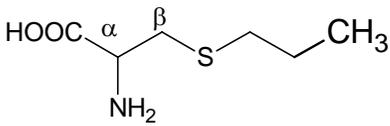
Figura 14. Síntesis de la SPC a partir del clorhidrato de L-cisteína y el bromuro de propilo.

Al caracterizar a la SPC por IR (espectro 7) se observó a  $3429\text{ cm}^{-1}$  una banda de intensidad media que corresponde al estiramiento de enlace N-H de la amina primaria, así también se encontraron bandas intensas de absorción a  $2871$  y  $2961\text{ cm}^{-1}$ , pertenecientes al estiramiento del enlace C-H,



así como una banda intensa característica del ácido carboxílico a  $1619\text{ cm}^{-1}$  (Tabla 9).

Tabla 9. Caracterización estructural de la SPC.

Compuesto	SPC
	<b>RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)</b> -CH <sub>3</sub> 3.71 (t, J = 7.4, 3H) -CH <sub>2</sub> 4.37 (sext, J = 14.6, 2H) S-CH <sub>2</sub> 5.34 (t, J = 7.4, 2H) CH <sub>2</sub> -S HB <sub>1</sub> 5.87 [(dd, J = 14.6, 4.4 ) HB <sub>2</sub> 5.77 (dd, J = 14.8, 7.6)]2H H <sub>α</sub> 6.71(dd, J = 7.6, 1H)
<b>Punto de fusión</b> 205-206°C	<b>IR (KBr, cm<sup>-1</sup>)</b> 3429 (-NH), 2871-2961 (-CH), 1580(-COO-), 1619 (-COO)
<b>Rendimiento</b> 70%	<b>EM (IE) m/z:</b> 163(M <sup>+</sup> , 8.0), 161(2.0), 118 (17.0), 41(90.0), 74(37), 61(41.0), 76(51.0), 89 (100.0) C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> SO <sub>2</sub> N
<b>Rotación Específica</b> -11.67[α] <sub>D</sub> <sup>t</sup> [H <sub>2</sub> O caliente]	
<b>Factor de desplazamiento</b> 0.75	

En el espectro de RMN<sup>1</sup>H (espectro 8) se observa a 3.71 ppm una señal triple que integra para 3 protones que corresponden al metilo terminal de la SPC, así mismo se observa en 4.37 ppm una señal séxtuple que corresponde al CH<sub>2</sub> adyacente al CH<sub>3</sub>. En 5.34 ppm se observa una señal triple que integra para 2 protones cercanos al azufre. En 5.87 ppm se observa un doble de dobles que integra para 2 protones que corresponden a los protones β al grupo carbonilo. Por último, se observa en 6.71 ppm un doble de dobles que integran para 1 protón que corresponde al protón α al grupo carbonilo (Tabla 9).

En el espectro de EM (espectro 9) se observa al ión molecular en 163 m/z con una abundancia relativa de 8.0% que corresponde al peso molecular de la SPC, así como el pico base en 89 m/z (Tabla 9). El patrón de fragmentación sugerido para la SPC se muestra en la figura 15:

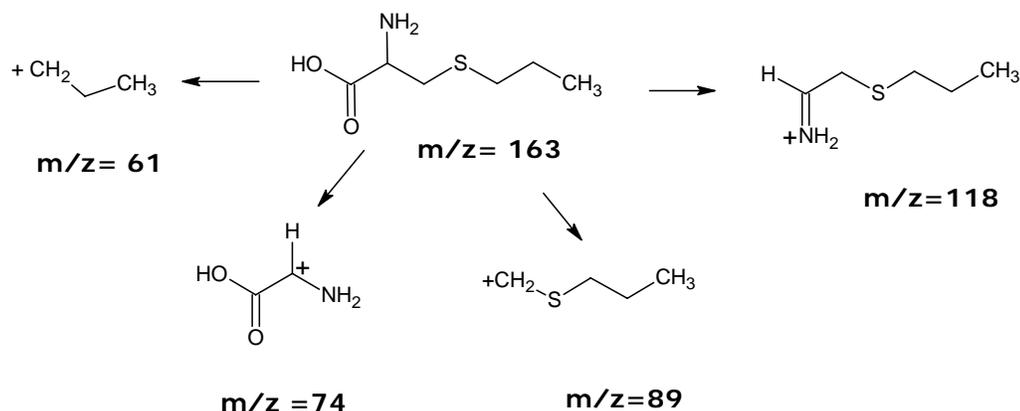


Figura 15. Patrón de fragmentación propuesto para la SPC.

Cabe mencionar que los rendimientos de los compuestos sintetizados fueron en promedio del 70%, debido a la naturaleza de la reacción y de los reactivos. Se sabe que la interacción del sodio metálico-agua reacciona de manera exotérmica perdiendo su funcionalidad en el medio de reacción. Por lo cual es importante que la reacción se realice bajo condiciones anhidras (EtOH absoluto, trampa de cloruro de calcio, etc).

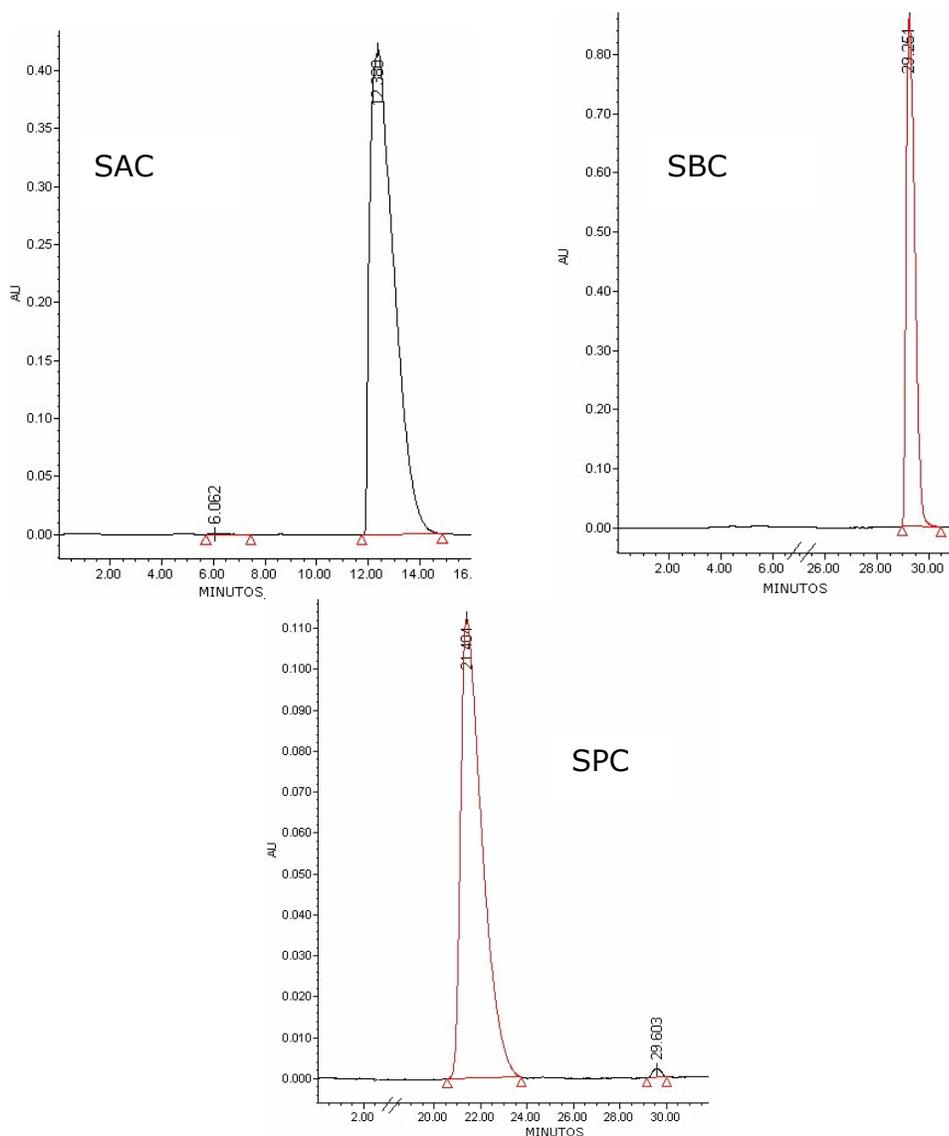
Una parte indispensable en cada una de las síntesis radica en la completa remoción de la mezcla etanol-agua, para después precipitar con la cantidad exacta de ácido acético, de lo contrario, el rendimiento de la reacción disminuye o no se obtiene el producto debido a la solubilidad de los derivados en agua.

## b) DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DE LA SAC, LA SBC Y LA SPC

La pureza de los compuestos obtenidos en la síntesis se muestra en la figura 16. En cada caso, se aprecia un pico mayoritario con un tiempo de retención de 12.30, 29.251, 21.404 min, para la SAC, la SBC y la SPC, respectivamente. Esto indica la ausencia de impurezas apreciables, en los compuestos sintetizados. Es interesante señalar como el sustituyente



incorporado a la cisteína afecta el tiempo de retención. El mayor tiempo se observa en la SBC, la cual presenta un grupo liposoluble en su estructura.



**Figura 16.** Cromatograma de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución de la SAC, la SBC y la SPC. Se empleó una columna Phenomenex C18 de 4.5 mm de diámetro interno, 250 mm de largo y un tamaño de partícula de 5 micras. La identificación se realizó empleando un detector de UV Waters 2487 a 330 nm. El flujo fue 0.8 mL/min en fase isocrática de fosfatos 50 mM pH=6.5-ACN-MeOH 50:28:22.



### B. EVALUACIÓN IN VITRO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LA SAC, LA SBC Y LA SPC

*Diversas publicaciones han documentado la capacidad de atrapar radicales libres de los principales compuestos sulfurados presentes en el EAE, la SAC y la S-alilmercaptocisteína.*

*Pedraza-Chaverrí y col [71] reportaron que la S-alilmercaptocisteína atrapa  $^1O_2$  y  $\bullet OH$  in vitro, y disminuye el daño renal inducido por la gentamicina, debido a que atenúa el estrés oxidativo y nitrosativo in vivo.*

*Lip [60] reportó que la alina, la SAC y el dialilsulfuro atrapan  $\bullet OH$ ; además, el dialilsulfuro atenúa la LPx inducida por el  $FeSO_4$ /ácido ascórbico en membranas microsomales, efecto que no se observa con la SAC. Por otro lado, Chien-Ning y col [72], encontraron que la SAC, la SPC, la S-etilcisteína, la S-metilcisteína, el dialilsulfuro y el dialdisulfuro impiden la oxidación y la glucosilación de las lipoproteínas de bajo peso molecular, proponiendo que el uso de estos compuestos podría impedir el desarrollo del daño asociado con enfermedades vasculares.*

*Recientemente, Medina-Campos y col [30] reportaron que la SAC atrapa diferentes ERO y ERN ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\bullet OH$ ,  $ONOO^-$ ,  $HOCl$  y  $^1O_2$ ) y calcularon el valor de  $CI_{50}$  para cada especie radical. Sin embargo hasta ahora, no existe ningún reporte en el que se evalué que componente(s) de la molécula de la SAC es (son) el(los) responsable(s) de la actividad antioxidante que ésta presenta. En este contexto, Moriguchi y col [43] reportaron que la SAC y otros compuestos presentes en el EAE, promueven la sobrevivencia de cultivos primarios de neuronas. Además, demostraron que la presencia del grupo alilo cerca del átomo azufre es necesaria para promover la ramificación neuronal (actividad neurotrófica), ya que aquellos compuestos que presentan un grupo diferente unido al átomo de azufre (S-propilcisteína, S-(1-propenil)-L-cisteína, etc), así como un átomo diferente al azufre*



(oxígeno o nitrógeno) no muestran dicha actividad. Este es el único reporte en la literatura en el que se evalúa que parte de la molécula de la SAC es la responsable de cierta propiedad.

Debido a lo anterior, en este trabajo se evaluó la importancia del grupo alilo sobre la propiedad antioxidante de la SAC, sintetizando dos compuestos similares a la SAC, la SPC y la SBC. En la SPC se saturó la doble ligadura del grupo alilo, ya que se incorporó un grupo *n*-propilo en lugar del alilo, mientras que en la SBC se incorporó un grupo voluminoso como lo es el grupo bencilo.

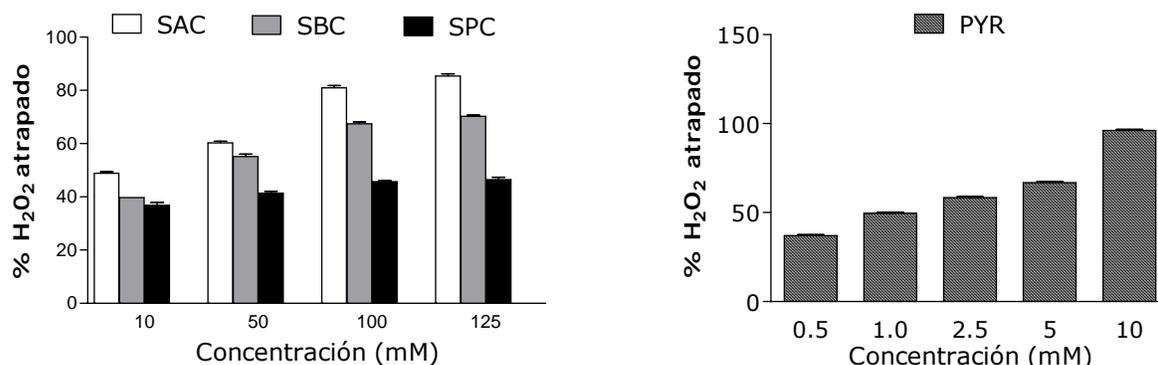
### a) Ensayo de actividad antioxidante para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La fuente intracelular más importante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es la mitocondria, derivado de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa y los peroxisomas, producto de las reacciones catalizadas por diferentes oxidasas. Aunque el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no es un radical libre, es de gran importancia porque puede atravesar las membranas celulares y generar en sitios distantes a donde de produjo, especies radicales altamente oxidantes. Por ejemplo, puede reaccionar con el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en presencia de Fe<sup>2+</sup> o Cu<sup>+</sup> y generar el •OH. Por esta razón se le considera un oxidante importante en las células de los organismos aerobios [54].

La actividad antioxidante de los compuestos evaluados se ilustra en la Figura 17, donde se observa que sólo la SAC y la SBC atraparon al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de manera dosis-dependiente. Como estándar se empleó el piruvato (PYR), que también mostró un comportamiento dosis-dependiente. El valor de CI<sub>50</sub> para la SAC y la SBC fue de 13.11 ± 0.15 mM y 23.81 ± 0.20 mM respectivamente, mientras que el valor para el PYR fue de 1.18 ± 0.24 mM (Tabla 10). El valor de CI<sub>50</sub> indica que el PYR es un mejor atrapador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



comparado con la SAC y la SBC. No se pudo determinar el valor de  $CI_{50}$  para la SPC, debido a que éste no atrapó  $H_2O_2$  de forma dosis-dependiente.



**Figura 17.** Capacidad atrapadora de la S-alilcisteína (SAC), la S-bencilcisteína (SBC), la S-propilcisteína (SPC) y el piruvato (PYR) para  $H_2O_2$ . Los resultados se presentan como la media  $\pm$  DS,  $n = 4$ .

La SAC atrapó mejor al  $H_2O_2$  que la SBC, lo que se podría atribuir a que este último posee un grupo voluminoso (fenilo) que podría estar generando impedimento estérico. Por otra parte, al parecer es importante la presencia de un sistema insaturado para tener una actividad antioxidante, esto se apoya en los resultados obtenidos con la SPC, que carece de electrones  $\pi$  y no muestra la misma actividad que la SAC o la SBC. Al comparar el valor de  $CI_{50}$  se observa una diferencia significativa entre la SAC y la SBC, así como entre los compuestos evaluados y el PYR. Esto indica que la SAC es un antioxidante de actividad media para atrapar  $H_2O_2$  seguido de la SBC, mientras que la SPC es un mal atrapador.

Tabla 10. Valor de  $CI_{50}$  para  $H_2O_2$ .

Compuesto	$CI_{50}$ (mM)
SAC	$13.11 \pm 0.15^*$
SBC	$23.81 \pm 0.20^{*,a}$
SPC	ND
PYR	$1.18 \pm 0.24$

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  DS.

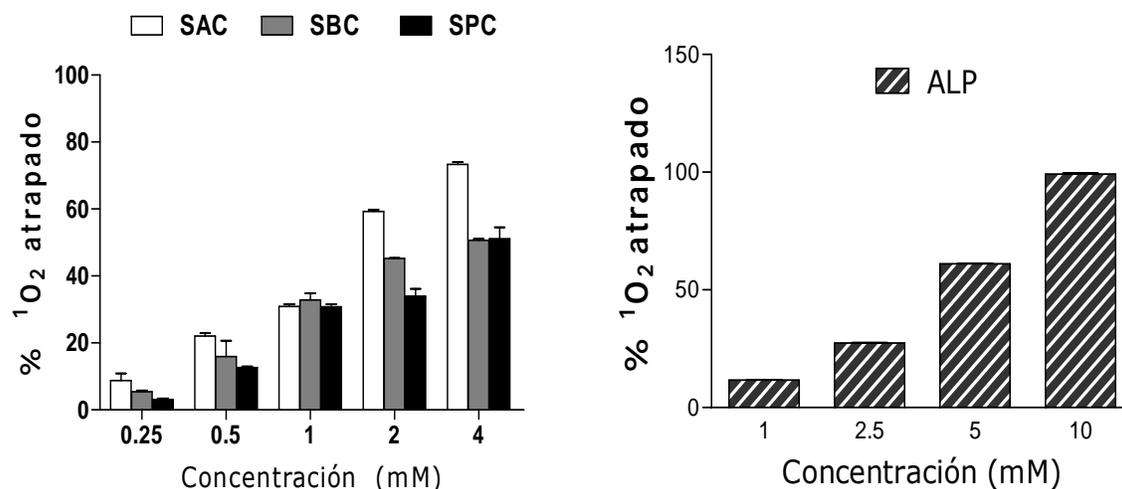
\* $p < 0.0001$  vs PYR y  $^a p < 0.001$  vs SAC.

$CI_{50}$ : Concentración inhibitoria al 50%.

b) Ensayo de actividad antioxidante para  $^1\text{O}_2$ 

El  $^1\text{O}_2$  se origina cuando uno de los electrones desapareados del  $\text{O}_2$  absorbe energía e invierte su rotación dando el  $^1\text{O}_2$ . Existen dos formas del  $^1\text{O}_2$ : 1) la sigma (S), que es un RL debido a que conserva los dos electrones desapareados en los orbitales moleculares externos  $2p^*$  y 2) la delta (D), que no es un RL ya que posee dos electrones apareados en un solo orbital  $2p^*$ . La forma S es muy inestable y puede oxidar proteínas, el ADN y algunos lípidos [50], incluso es relevante en el desarrollo de diversas patologías tales como el cáncer y las cataratas [30].

La capacidad de atrapar  $^1\text{O}_2$  de los compuestos evaluados se presenta en la figura 18, donde se observa que la SAC inhibe con mayor eficiencia que la SBC y la SPC, la reacción del  $^1\text{O}_2$  con la dimetilnitrosoanilina. Como estándar se empleó el ácido lipóico (ALP).



**Figura 18.** Capacidad atrapadora de la S-alilcisteína (SAC), la S-bencilcisteína (SBC), la S-propilcisteína (SPC) y el ácido lipóico (ALP) para  $^1\text{O}_2$ . Los resultados se presentan como la media  $\pm$  DS. n = 8.



El valor de  $CI_{50}$  para la SAC fue  $1.59 \pm 0.98$  mM, para la SBC fue  $4.38 \pm 1.56$  mM, para la SPC fue  $4.08 \pm 1.09$  mM y para el ALP fue  $3.3 \pm 0.2$  mM (Tabla 11). Estos resultados indican que la SAC atrapa mejor al  $^1O_2$  que la SBC y la SPC e incluso que el estándar. Además, estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Medina-Campos y col [30] quienes encontraron que la SAC es un mejor atrapador de  $^1O_2$  que el ALP y sugieren que la SAC podría disminuir el daño asociado con el  $^1O_2$ , que generan numerosas enfermedades como las cataratas, algunos tipos de cáncer y ciertas quemaduras.

**Tabla 11.** Valor de  $CI_{50}$  para  $^1O_2$ .

<b>Compuesto</b>	<b><math>CI_{50}</math> (mM)</b>
SAC	$1.59 \pm 0.98^*$
SBC	$4.38 \pm 1.56^{*a}$
SPC	$4.08 \pm 1.09^*$
ALP	$3.30 \pm 0.21$

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  DS.

\* $p < 0.001$  vs ALP, <sup>a</sup> $p < 0.001$  vs SAC.

$CI_{50}$ : Concentración inhibitoria al 50%.

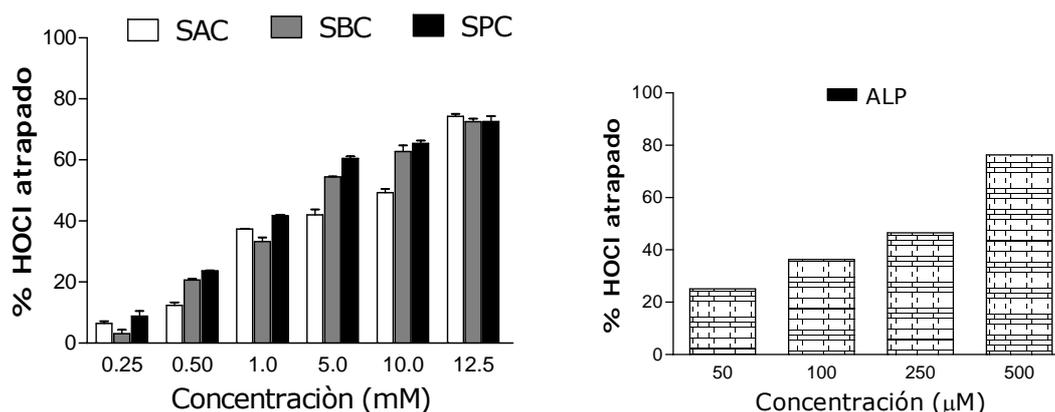
Debido a la naturaleza oxidante del  $^1O_2$  y sus posibles interacciones con los compuestos antioxidantes evaluados, se puede especular que el efecto antioxidante podría estar asociado con la presencia del grupo tioéster en el compuesto, además de los electrones disponibles de las dobles ligaduras que se acoplan con los electrones desapareados del  $^1O_2$ . Esto sugiere que entre más disponibles se encuentren los electrones, mayor será el efecto antioxidante. Los resultados obtenidos en este ensayo apoyan esta idea y sugieren que la disponibilidad de los electrones es mayor en la SAC seguido por la SBC y finalmente por la SPC, que no presenta un sistema insaturado. La SBC que aunque cuenta con electrones pi, éstos no están tan disponibles para reaccionar dado que perdería aromaticidad.



c) Ensayo de actividad antioxidante para HOCl

*La mayor parte del  $O_2^{\bullet-}$  generado in vivo se dismuta lentamente en un proceso no enzimático o rápidamente en un proceso catalizado por las isoformas de la superóxido dismutasa, dando lugar a la formación de  $H_2O_2$ . El potencial oxidante del  $H_2O_2$ , puede ser amplificado por la peroxidasa de los eosinófilos y la mieloperoxidasa de los neutrófilos, que lo emplean como sustrato junto con compuestos halogenados para generar agentes tóxicos, como el HOCl o el HOBr. La afinidad de las peroxidasas por los distintos halógenos no es absoluta. La mieloperoxidasa puede funcionar en presencia de cualquiera de ellos; sin embargo, utiliza 20 veces mejor el  $Cl^-$  para generar fundamentalmente HClO, un potente agente bactericida. El efecto inducido por las peroxidasas es mediado por dos mecanismos: el daño oxidativo y la halogenación de biomoléculas. En algunos casos, cuando la generación es excesiva puede causar daño tisular y hemólisis [73], así como combinarse con aminas de bajo peso molecular formando las cloraminas [74]. El HOCl es un fuerte oxidante y reacciona rápidamente con tioles y aminas, modificando diferentes proteínas y enzimas [30].*

*La capacidad de atrapar HOCl de los compuestos se muestra en la figura 19, donde se observa que la SAC, la SBC y la SPC atrapan al HOCl de manera dosis-dependiente. Como estándar se utilizó el ALP (50-500  $\mu M$ ).*



**Figura 19.** Capacidad atrapadora de la S-alicisteína (SAC), la S-bencilcisteína (SBC), la S-propilcisteína (SPC) y el ácido lipóico (ALP) para HOCl. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  DS.  $n = 8$ .

El valor de  $CI_{50}$  de la SAC ( $4.3 \pm 1.27$ ) fue mayor que el del ALP ( $1.83 \pm 1.40$ ), el de la SBC ( $2.85 \pm 0.84$ ) y el de la SPC ( $2.22 \pm 0.78$ ). Esto indica que la SBC y la SPC atrapan mejor el HOCl que la SAC; sin embargo, éstos son menos eficientes que el ALP (Tabla 12).

**Tabla 12.** Valor de  $CI_{50}$  para HOCl.

Compuesto	$CI_{50}$ (mM)
SAC	$4.30 \pm 1.27^*$
SBC	$2.85 \pm 0.84^a$
SPC	$2.22 \pm 0.78^a$
ALP	$1.83 \pm 1.40$

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  DS.

\* $p < 0.05$  vs ALP,  $^a p < 0.001$  vs SAC.

$CI_{50}$ : Concentración inhibitoria al 50%.

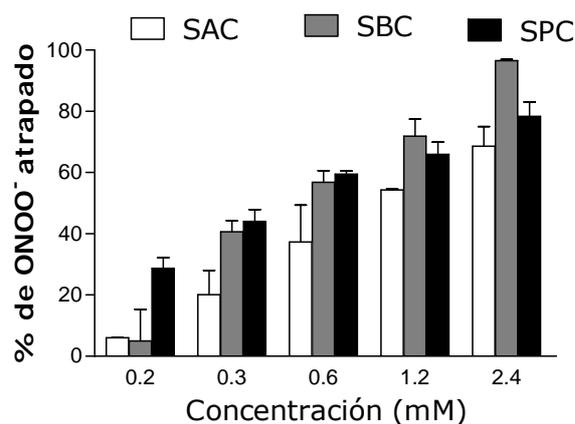
El comportamiento mostrado por los compuestos, sugiere que la capacidad de atrapar HOCl radica en la parte azufrada de la molécula favorecida por la estabilidad electrónica del anillo aromático que presenta la SBC. En cuanto al ALP se observa que en concentraciones micromolares atrapa cerca del 75% de HOCl, esto podría deberse a los 2 átomos de azufre que se encuentran en su estructura ( $C_8H_{18}O_2S_2$ ).



### d) Ensayo de actividad atrapadora para ONOO<sup>-</sup>

El ONOO<sup>-</sup> es un potente agente oxidante que se forma de la reacción entre el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y óxido nítrico. El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> puede ser producido enzimáticamente por diferentes oxidasas como la NADPH oxidasa, la óxido nítrico sintasa, la xantina oxidasa, la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa, entre otras; así como por vías no enzimáticas en diversos sitios celulares como en la mitocondria, por la reducción incompleta del O<sub>2</sub> cuando se le adiciona un electrón. Por otra parte, el óxido nítrico es sintetizado por la óxido nítrico sintasa a partir de L-arginina, O<sub>2</sub> y NADPH. El ONOO<sup>-</sup> puede inducir la nitración de residuos de tirosina de las proteínas, promoviendo la formación de 3-nitrotirosina. Esta modificación ha sido muy estudiada y aunque no es producida exclusivamente por ONOO<sup>-</sup> (también es producida por otras ERN), se acepta actualmente como una evidencia de la formación de ONOO<sup>-</sup>, así como se le ha sido implicada en diferentes patologías como en la diabetes, la hipertensión, la artritis, la colitis, la enfermedad de Alzheimer, Huntington y Parkinson, así como en diversas complicaciones cardiacas y renales [76].

En la Figura 20, se observa que la SAC, la SBC y la SPC atrapan al ONOO<sup>-</sup> de forma dosis-dependiente.



**Figura 20.** Capacidad atrapadora de la S-alilcisteína (SAC), la S-bencilcisteína (SBC) y la S-propilcisteína (SPC) para ONOO<sup>-</sup>. Los resultados se presentan como la media ± DS. n =8.



El valor de  $CI_{50}$  indica que los tres compuestos atrapan  $ONOO^-$  de la misma forma, ya que no son significativamente diferentes (Tabla 13).

**Tabla 13.** Valor de  $CI_{50}$  para  $ONOO^-$ .

<b>Compuesto</b>	<b><math>CI_{50}</math> (mM)</b>
SAC	$1.31 \pm 0.23$
SBC	$1.28 \pm 0.16$
SPC	$1.14 \pm 0.11$

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  DS.  
 $CI_{50}$ : Concentración inhibitoria al 50%.

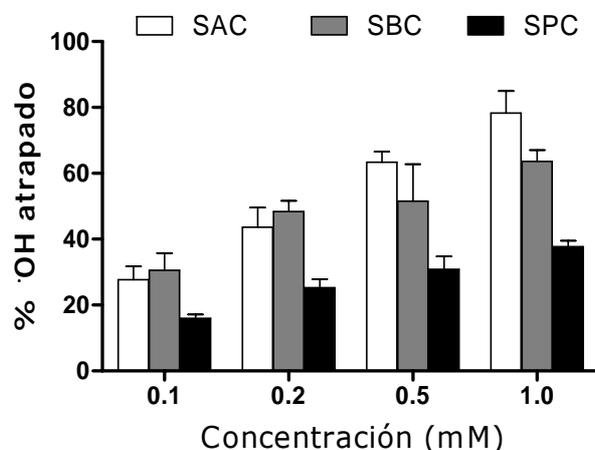
El efecto antioxidante de la SBC para el  $ONOO^-$  resulta de interés puesto que presenta un efecto antioxidante cercano al 100% a una concentración de 2.4 mM. Esto indica que es un excelente antioxidante para este radical, seguido de la SPC y la SAC. El comportamiento mostrado por los compuestos, podría estar asociado con la estabilidad que dan los electrones del azufre y no en su totalidad con parte del sistema insaturado. Sin embargo, al ver los resultados obtenidos con la SBC, se podría pensar que la carga electrónica adquirida al reaccionar con el  $ONOO^-$  se distribuye de manera uniforme en toda la molécula incluyendo el anillo aromático, potenciando así el efecto antioxidante. El efecto mostrado por la SAC, podría deberse a que no participa la doble ligadura en la reacción. Esto se deduce al observar el valor de  $CI_{50}$  de la penicilamina (0.03 mM) para el  $ONOO^-$  [30], ya que este compuesto no presenta ningún sistema insaturado en su estructura ( $C_5H_{11}O_2SN$ ).

#### e) Ensayo de actividad atrapadora para $\bullet OH$

El  $\bullet OH$  se considera como una de las especies oxidantes más dañinas. Por su alta reactividad, su vida media es muy corta. No tiene la capacidad de atravesar las membranas por lo que suele actuar en sitios cercanos a donde se produce. Puede reaccionar casi con cualquier biomolécula como los lípidos, las proteínas, el ADN o los carbohidratos. El  $\bullet OH$  puede formarse fácilmente por la Reacción de Haber-Weiss entre el  $O_2^{\bullet -}$  y el  $H_2O_2$  catalizada  $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$ , o por la Reacción de Fenton a partir de  $H_2O_2$  en presencia de  $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$  [54].



En la Figura 21 se muestra que la SAC, así como la SBC y la SPC tienen la capacidad de proteger a la albúmina contra la oxidación inducida por el  $\cdot\text{OH}$  de manera dosis dependiente.



**Figura 21.** Capacidad atrapadora de la S-allicisteína (SAC), la S-bencilcisteína (SBC) y la S-propilcisteína (SPC) para  $\cdot\text{OH}$ . Los resultados se presentan como media  $\pm$  DS.  $n = 4-6$ .

El valor de  $CI_{50}$  para cada compuesto indica que la SAC y la SBC atrapan mejor al  $\cdot\text{OH}$  comparado con la SPC (Tabla 14). Incluso el valor de  $CI_{50}$  de la SAC es menor al de la dimetiltiourea ( $0.47 \pm 0.06$  mM), compuesto que es un buen atrapador de  $\cdot\text{OH}$  [31]. La SAC y la SBC muestran un valor semejante de  $CI_{50}$  para el  $\cdot\text{OH}$ , siendo ligeramente menor para la SAC (aunque no se alcanza una diferencia significativa). Esto podría sugerir que la SAC reacciona más rápido, porque los electrones de la doble ligadura del grupo alilo están más disponibles, así como los electrones "libres" del azufre, permitiendo que interaccionen con mayor eficacia con el  $\cdot\text{OH}$ . La SPC mostró ser un mal atrapador de esta especie radical.

**Tabla 14.** Valor de  $CI_{50}$  para  $\cdot\text{OH}$ .

Compuesto	$CI_{50}$ (mM)
SAC	$0.27 \pm 0.12$
SBC	$0.35 \pm 0.19$
SPC	$3.80 \pm 0.13$

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  DS.  
 $CI_{50}$ : Concentración inhibitoria al 50%.

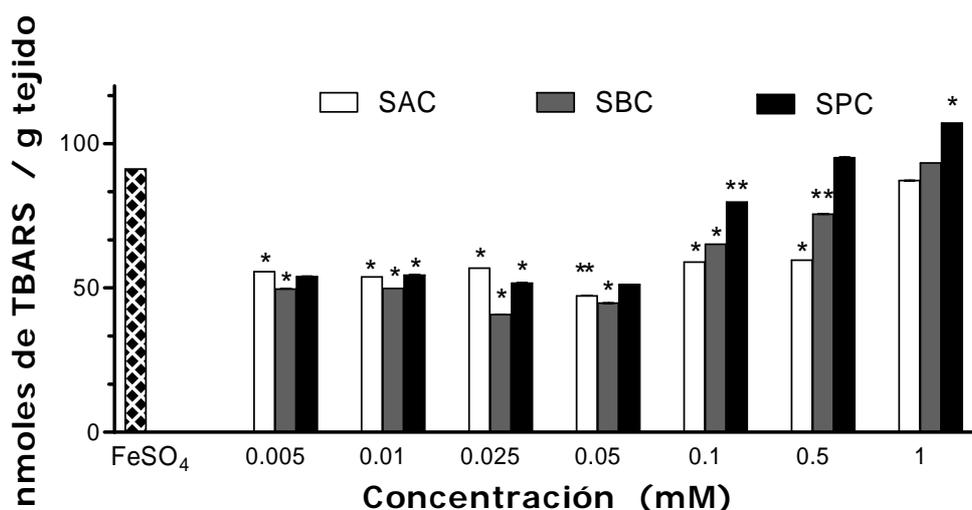


## C. PARTE BIOLÓGICA

## a) Ensayo de lipoperoxidación

En la Figura 22 se muestra que la SAC, la SBC y la SPC disminuyen el daño oxidativo inducido por el  $\text{FeSO}_4$  en un homogenado de cerebro de rata.

En cualquier sistema biológico existe un estado basal de producción de ERO, sobre todo las que provienen de la cadena respiratoria, lo que genera un nivel basal de daño oxidativo a los lípidos (LPx). En el ensayo que se empleó en este trabajo, se indujo la producción de  $\cdot\text{OH}$  con  $\text{FeSO}_4$  y se observó un incremento significativo en los niveles de LPx (Figura 22). También, se observó que la SAC, la SBC y la SPC a bajas concentraciones (0.005-0.05mM), inhiben la formación TBARS (Figura 22) y por lo tanto muestran un efecto antioxidante sobre el daño oxidativo a los lípidos (sí recordamos que un antioxidante es aquel que evita la oxidación de alguna molécula susceptible a ella) [59]. El efecto protector sobre los niveles de LPx era esperado ya que se los tres compuestos evaluados mostraron la capacidad de atrapar al  $\cdot\text{OH}$  (Figura 21).



**Figura 22.** Efecto de la S-alilcisteína (SAC), la S-bencilcisteína (SBC) y la S-propilcisteína (SPC) sobre los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en un homogenado de cerebro de rata. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  DS. n = 8. \* $p < 0.001$  y \*\* $p < 0.05$  vs  $\text{FeSO}_4$ .



Por otro lado, cuando se emplean concentraciones por arriba de 0.5 mM para la SAC, de 0.1 mM para la SBC y de 0.05 mM para la SPC, los compuestos promueven el daño oxidativo a los lípidos, cambiando su comportamiento de agente antioxidante a pro-oxidante. Posiblemente, esto se deba a que el  $\cdot\text{OH}$  ataca a los compuestos evaluados, así como a los derivados generados por el radical. En el caso de la SPC, se puede observar que la concentración necesaria para inducir LPx es menor comparado con la SBC (0.05 mM y 0.1 mM, respectivamente), lo que podría sugerir que el anillo aromático es capaz de estabilizar mejor la carga electrónica del medio, pero al llegar al límite de saturación del compuesto se induce la sobreproducción de radicales. En el caso de la SAC, la concentración para tener un efecto oxidante está por arriba de 0.5 mM, sugiriendo que el efecto antioxidante de este compuesto podría estar asociado con la libertad de los electrones en el sistema insaturado presente en el grupo alilo. De acuerdo con estos resultados, Perez-Severanio y col [77] reportaron que la administración de SAC en ratas, con una dosis de 150 a 300 mg/kg peso, previene el incremento en el nivel de LPx inducido por el ácido quinolinico en el cuerpo estriatal de rata. Sin embargo, cuando la SAC se administra en dosis superiores a 450 mg/kg de peso, se exagera el daño inducido por el ácido quinolínico. Una posible explicación de este efecto podría estar asociado con una alteración en el balance entre los tioles protectores y los nitrosotioles potencialmente tóxicos, lo cual puede ocurrir si el contenido de tioles (independientemente de la fuente) alcanza cantidades excesivas que llevan a su propia inactivación y o a la formación de nitrosotioles, lo que puede ocurrir cuando el óxido nítrico está disponible [77,78].



IX. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron y caracterizaron por métodos espectroscópicos los siguientes compuestos:

*S-alilcisteína, SAC, ácido 2-amino-3-(aliltio)propanoico*

*S-bencilcisteína, SBC, ácido 2-amino-3-(propiltio)propanoico*

*S-propilcisteína, SPC, ácido 2-amino-3-(benciltio)propanoico*

2. La síntesis de los mismos se realizó mediante una metodología sencilla, a partir de L-cisteína, con un rendimiento cercano al 70%.
3. Se evaluaron las propiedades antioxidantes de los compuestos sintetizados. Se observó que dependiendo del sustituyente incorporado en la L-cisteína la actividad antioxidante varía, siendo en la mayoría de los casos la S-alilcisteína la más activa. Lo que lleva a proponer que al parecer es importante un sistema insaturado cercano al átomo de azufre del tioéter para mostrar capacidad antioxidante.

**X. BIBLIOGRAFÍA**

1. Sato T, Miyata G. 2000. *The nutraceutical benefit, part IV: Garlic. Nutrition* **16**:787-788
2. <http://faostat.fao.org/>
3. Kathi J, Kemper MD. 2002. *Garlic (Allium sativum). The Longwood Herbal Task Force. The Center for Holistic Pediatric Education and Research* <http://www.longwoodherbal.org/garlic/garlic.pdf>
4. Amagase H. 2006. *Clarifying the real constituents of garlic. J Nutr* **136**:716S-725S
5. Lawson LD. 1998. *Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity. ACS Symposium Series 691. Lawson LD, Bauer R, (eds). Washington, DC, USA. American Chemical Society:176-209*
6. Stoll A, Seebeck E. 1948. *Alliin the true mother compound of garlic oil. Helv Chim Acta* **31**:189-210
7. Lawson LD, Gardner G. 2005. *Composition, stability, and bioavailability of garlic products used in a clinical trial. J Agric Food Chem* **53**:6254-6261
8. <http://lib.bioinfo.pl/meid:210305>
9. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. 2001. *Intake of garlic and its bioactive components. J Nutr* **131**:955S-962S
10. Lawson LD, Wang ZJ, Hughes BG. 1991.  *$\gamma$ -glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other Allium sp: precursors of AGE-dependent trans-trans-1-propenyl. J Nat Prod* **54**:436-444
11. Mukherjee PK, Maulik SK. 2003. *Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. Phytother Res* **17**:97-106
12. *Aged garlic extract. 2006. Research excerpts from peer reviewed scientific journals & scientific meetings. Wakunaga of America Co., LTD. Mission Viejo, CA, USA. pp 1, 45*
13. Weinberg DS, Manier ML, Richardson MD, Haibach FG. 1993. *Identification and quantification of organosulfur compliance markers in garlic extract. J Agric Food Chem* **41**:37-41



14. Borek C. 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* **131**:1010S-1015S
15. Lawson LD. 1996. The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In: *Garlic. The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and related species*. Koch HP, Lawson LD (eds). Baltimore, MD, USA. Williams & Wilkins: 37-107
16. Yoshida S, Hirao Y, Nakagawa S. 1984. Mutagenicity and cytotoxicity tests of garlic. *J Toxicol Sci* **9**:77-86
17. Munday JS, James KA, Fray LM, Kirkwood SW, Thompson KG. 1999. Daily supplementation with aged garlic extract, but not raw garlic, protects low density lipoprotein against in vitro oxidation. *Atherosclerosis* **143**:399-404
18. Takasu J, Uykimpang R, Sunga MA, Amagase H, Niihara Y. 2002. Aged garlic extract therapy for sickle cell anemia patients. *BMC Blood Disord* **2**:1-4
19. Dillon SA, Lowe GM, 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
20. Budoff MJ, Takasu J, Flores FR, Niihara Y, Lu B, Lau BH, Rosen RT, Amagase H. 2004. Inhibiting progression of coronary calcification using aged garlic extract in patients receiving statin therapy: a preliminar study. *Prev Med* **39**:985-991
21. Durak I, Aytac B, Atmaca Y, Devrim E, Avci A, Erol C, Oral D. 2004. Effects of garlic extract consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in atherosclerotic patients. *Life Sci* **75**:1959-1966
22. Ide N, Lau BH. 2001. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor- $\kappa$ B activation. *J Nutr* **131**:1020S-1026S
23. Ide N, Matsuura H, Itakura Y. 1996. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother Res* **10**:340-341



24. Yamasaki T, Li L, Lau BH. 1994. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Phytother Res* **8**:408-412
25. Higuchi O, Tateshita K, Nishumura H. 2003. Antioxidative activity of sulfur-containing compounds in *Allium* species for human low-density lipoprotein (LDL) oxidation in vitro. *J Agric Food Chem* **51**:7208-7214
26. Ho SE, Ide N, Lau BH. 2001. S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine* **8**:39-46
27. Geng Z, Rong Y, Lau BH. 1997. S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic Biol Med* **23**:345-350
28. Mostafa MG, Mima T, Ohnishi ST, Mori K. 2000. S-allylcysteine ameliorates doxorubicin toxicity in the heart and liver in mice. *Planta Med* **66**:148-151
29. Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J. 2003. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med* **35**:317-324
30. Medina-Campos ON, Barrera D, Segoviano-Murillo S, Rocha D, Maldonado PD, Mendoza-Patiño N, Pedraza-Chaverri J. 2007. S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK1 cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food Chem Toxicol* **45**:2030-2039
31. Numagami Y, Ohnishi ST. 2001. S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *J Nutr* **131**:1100S-1105S
32. Numagami Y, Sato S, Ohnishi ST. 1996. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochem Int* **29**:135-143
33. [Kim JM](#), [Lee JC](#), [Chang N](#), [Chun HS](#), [Kim WK](#). 2006. S-Allyl-L-cysteine attenuates cerebral ischemic injury by scavenging peroxynitrite and inhibiting the activity of extracellular signal-regulated kinase. [Free Radic Res](#) **40**:827-835
34. Kim KM, Chun SB, Koo MS, Choi WJ, Kim TW, Kwon YG, Chung HT, Billiar TR, Kim YM. 2001. Differential regulation of NO availability



- from macrophages and endothelial cells by the garlic component *S*-allyl cysteine. *Free Radic Biol Med* **30**:747-756
35. Perez-Severiano F, Salvatierra-Sanchez R, Rodriguez-Perez M, Cuevas-Martinez EY, Guevara J, Limon D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Santamaria A. 2004. *S*-allylcysteine prevents amyloid- $\beta$  peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *Eur J Pharmacol* **489**:197-202
36. Hsu CC, Huang CN, Hung YC, Yin MC. 2004. Five cysteine-containing compounds have antioxidative activity in Balb/cA mice. *J Nutr* **134**:149-152
37. Ito Y, Ito M, Takagi N, Saito H, Ishige K. 2003. Neurotoxicity induced by amyloid  $\beta$ -peptide and ibotenic acid in organotypic hippocampal cultures: protection by *S*-allyl-L-cysteine, a garlic compound. *Brain Res* **985**:98-107
38. Ito Y, Kosuge Y, Sakikubo T, Horie K, Ishikawa N, Obokata N, Yokoyama E, Yamashina K, Yamamoto M, Saito H, Arakawa M, Ishige K. 2003. Protective effect of *S*-allyl-L-cysteine, a garlic compound, on amyloid  $\beta$ -protein-induced cell death in nerve growth factor-differentiated PC12 cells. *Neurosci Res* **46**:119-125
39. [Sundaresan S](#), [Subramanian P](#). 2008. Prevention of *N*-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by *S*-allylcysteine. [Mol Cell Biochem](#) (en prensa)
40. Cheng-Chin H, Chun-Che L, Ting-Sin L, Mei-Chin Y. 2006. Protective effect of *S*-allyl cysteine and *S*-propyl cysteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol* **44**:393-397
41. Herrera-Mundo MN, Silva-Adaya D, Maldonado PD, Galvan-Arzate S, Andres-Martinez L, Perez-De La Cruz V, Pedraza-Chaverri J, Santamaria A. 2006. *S*-allylcysteine prevents the rat from 3-nitropropionic acid-induced hyperactivity, early markers of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Neurosci Res* **56**:39-44
42. [Liu L](#), [Yeh YY](#). 2001. Water-soluble organosulfur compounds of garlic inhibit fatty acid and triglyceride syntheses in cultured rat hepatocytes. [Lipids](#) **36**:395-400



43. Moriguchi T, Matsuura H, Kodera Y, Itakura Y, Katsuki H, Saito H, Nishiyama N. 1997. Neurotrophic activity of organosulfur compounds having a thioallyl group on cultured rat hippocampal neurons. *Neurochem Res* **22**:1449-1452
44. [Sener G](#), [Sakarcan A](#), [Yegen BC](#). 2007. Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Mol Nutr Food Res* **5**:1345-1352
45. Cruz C, Correa-Rotter R, Sanchez-Gonzalez DJ, Hernandez-Pando R, Maldonado PD, Martinez-Martinez CM, Medina-Campos ON, Tapia E, Aguilar D, Chirino RI, Pedraza-Chaverri J. 2007. Renoprotective and antihypertensive effects of S-allylcysteine in 5/6 nephrectomized rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**:F1691–F1698
46. Yan CK, Zeng FD. 2005. Pharmacokinetics and tissue distribution of S-allylcysteine in rats. *Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **5**:61-69
47. Nagae S, Ushijima M, Hatono S, Imai J, Kasuga S, Matsuura H, Itakura Y, Higashi Y. 1994. Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Med* **60**:214-217
48. Yukihiro K, Ayumi S, Osamu I. 2002. Physical, chemical, and biological properties of S-allylcysteine, an amino acid derived from garlic. *J Agric Food Chem* **50**:622-632
49. Boveris A. 2005. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars Pharm* **46**:85-95
50. Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* **141**:312-322
51. Moro MA, Almeida A, Bolanos JP, Lizasoain I. 2005. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radic Biol Med* **39**:1291-1304
52. Mates JM, Perez-Gomez C, Nuñez De Castro I. 2002. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochem* **32**:595-603
53. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**:1043-1046



54. Sas K, Robotka H, Toldo J, Vécsei L. 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurological Sci* **275**:221-239
55. 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**:278-286
56. Long LH, Evans PJ, Halliwell B. 1999. Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **262**:605-609
57. Wood ZA, Schröder E, Harris JR, Poole LE. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. [\*Trends Biochem Sci\* \*\*28\*\*:32-40](#)
58. Knight JA, Pleper RK, McClellan L. 1988. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clinical Chem* **34**:1988-2433
59. Pothiwong W, Laorpaksa P, Pirarat N, Sirisawadi S, Intarapanya J, Jianmongkol S. 2007. Autoxidation of brain homogenates from various animals as measured by thiobarbituric acid assay. [\*J Pharmacol Toxcol Methods\* \*\*56\*\*:336-338](#)
60. Lip C. 2006. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin and allyl disulfide. *J Med Food* **9**:205-213
61. Theodoropoulos D. 1959. Synthesis of Certain S-Substituted L-Cysteines. *Acta Chem Scand* **13**:383-384
62. Long LH, Evans PJ, Halliwell B. 1999. Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **262**:605-609
63. Long LH, Halliwell B. 2001. Antioxidant and prooxidant abilities of foods and beverages. *Methods Enzymol* **335**:181-190
64. Floriano-Sanchez E, Villanueva C, Medina-Campos ON, Rocha D, Sanchez-Gonzalez DJ, Cardenas-Rodriguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion, and hypochlorous acid and prevents in vivo tyrosine nitration in lung. *Free Radic Res* **40**:523-533



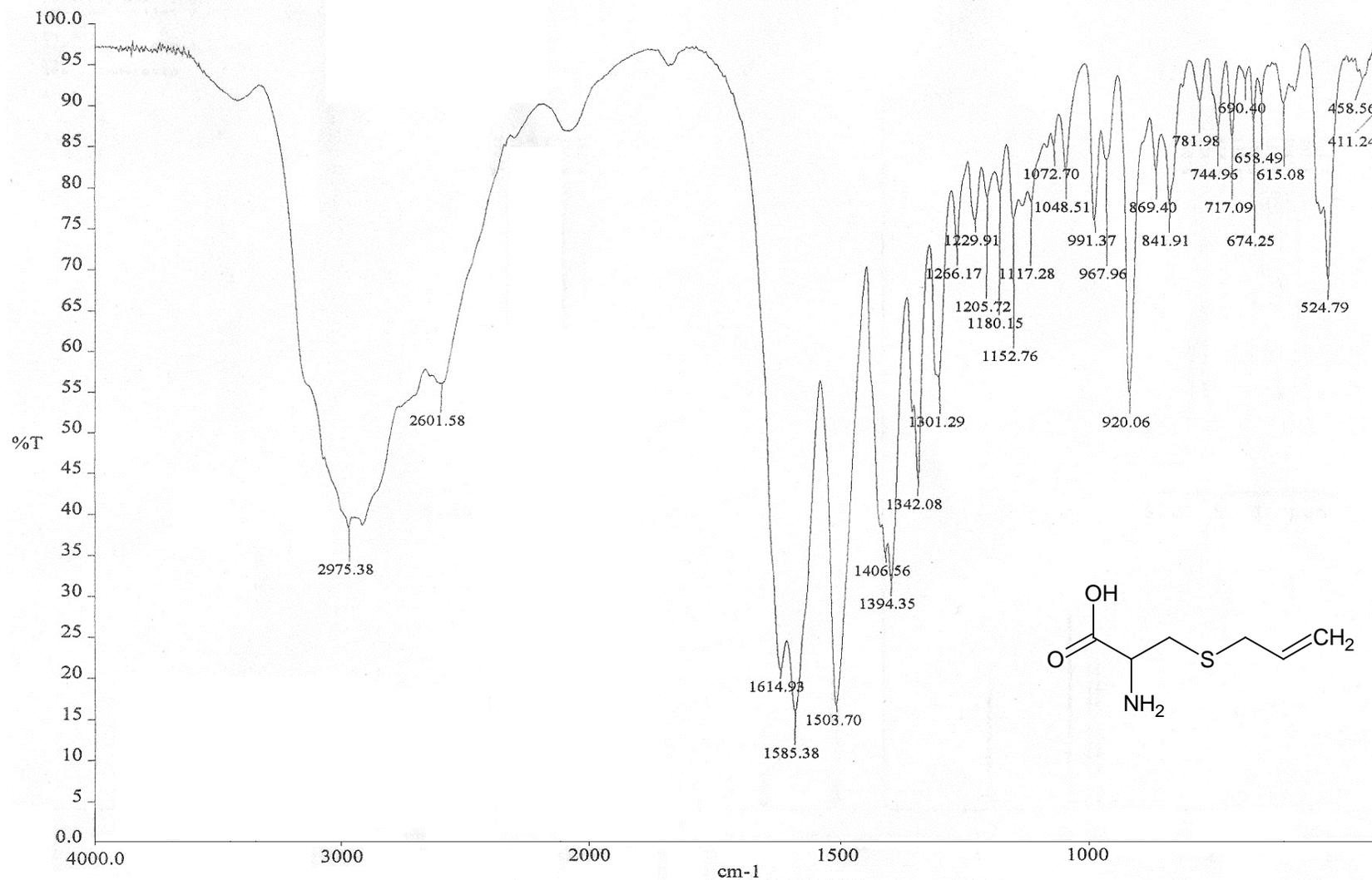
65. Ching TL, Jong J, Bast A. 1994. A method for screening hypochlorous-acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to anti-asthmatic drugs. *Anal Biochem* **218**:377-381
66. Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. 1994. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol* **233**:229-240
67. Kocha T, Yamaguchi M, Ohtaki H, Fukuda T, Aoyagi T. 1997. Hydrogen peroxide-mediated degradation of protein: different oxidation modes of copper- and iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin. *Biochim Biophys Acta* **1337**:319-326
68. Rios C, Santamaria A. 1991. Quinolic acid a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res* **16**:1139-1143
69. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/13310>
70. Valentine H, Amarnath K, Amarnath V, Li W, Ding X, Ichihara G. 2007. Globin S-Propyl cysteine and urinary N-acetyl-S-propyl cysteine as internal biomarkers of 1-bromopropane exposure. *Toxicol Sci* **21**:1-39
71. Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macias-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, Castro L, Salcedo MI, Hernandez-Pando R. 2004. 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**: 30-35
72. Chien-Ning H, Joeu-Shyan H, Mei-Chin Y. 2004. Antioxidative and antiglycative effects of six organosulfur compounds in low-density lipoprotein and plasma. *J Agric Food Chem* **52**:3674-3678
73. [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/cardiologia/v19\\_n2/radical.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/cardiologia/v19_n2/radical.htm)
74. Noguchi N, Nakada A, Itoh Y, Niké E. 2002. Formation of active oxygen species and lipid peroxidation induced by hypochlorite. *Arch Biophys* **397**:440-447
75. <http://www.posgrado.unam.mx>
76. Chirino YI, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J. 2006. Role of peroxynitrite anion in different diseases. *Rev Invest Clin* **58**:350-8



77. Perez-Severanio F, Rodriguez-Perez, Pedraza-Chaverri, Maldonado PD, Medina Campos ON, Ortiz-Plata A, Sanchez-Garcia A, Villeda-Hernandez J, Galvan-Arzate S, Aguilera P, Santamaria A. 2004. S-allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int* **45**:1175-1183
78. D'Emilia DM, Lipton SA. 1999. Ratio of S-nitrosohomocyst(e)ine to homocyst(e)ine or other thiols determines neurotoxicity in rat cerebrocortical cultures. *Neurosci Lett* **265**:103-106

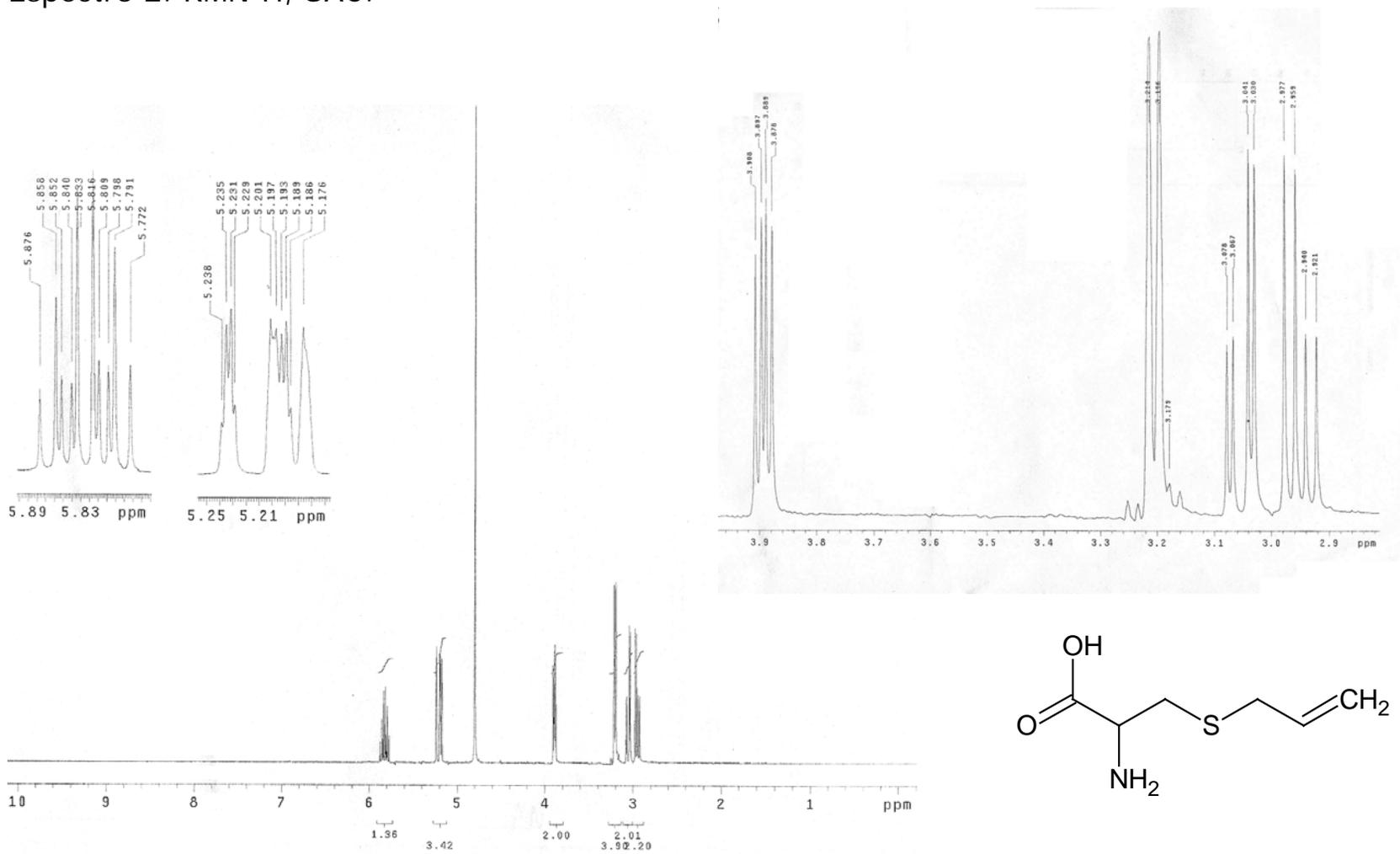


XI. ESPECTROS  
Espectro 1. IR, SAC.



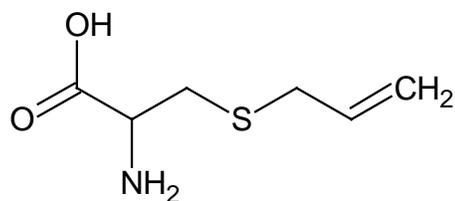
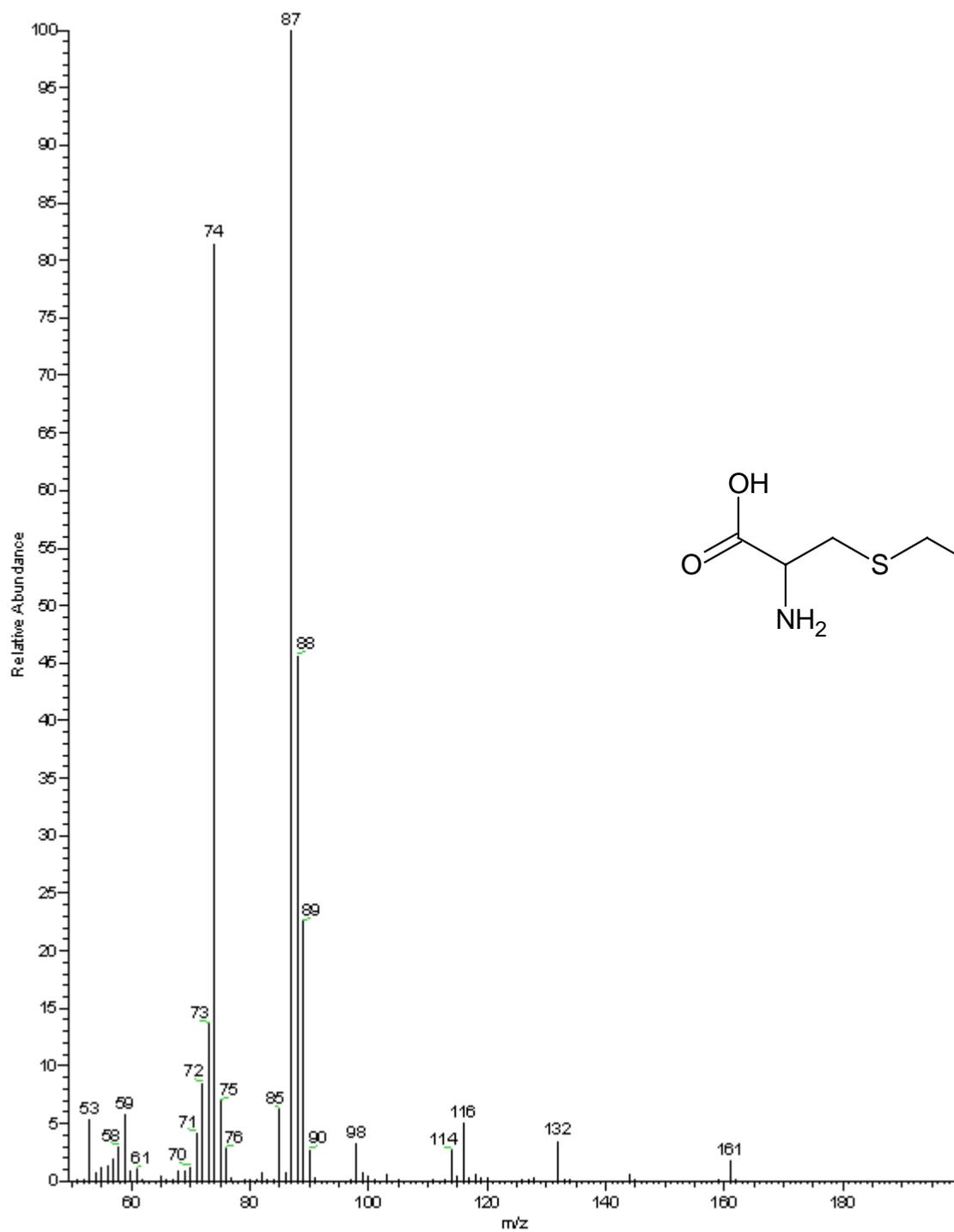


Espectro 2. RMN<sup>1</sup>H, SAC.



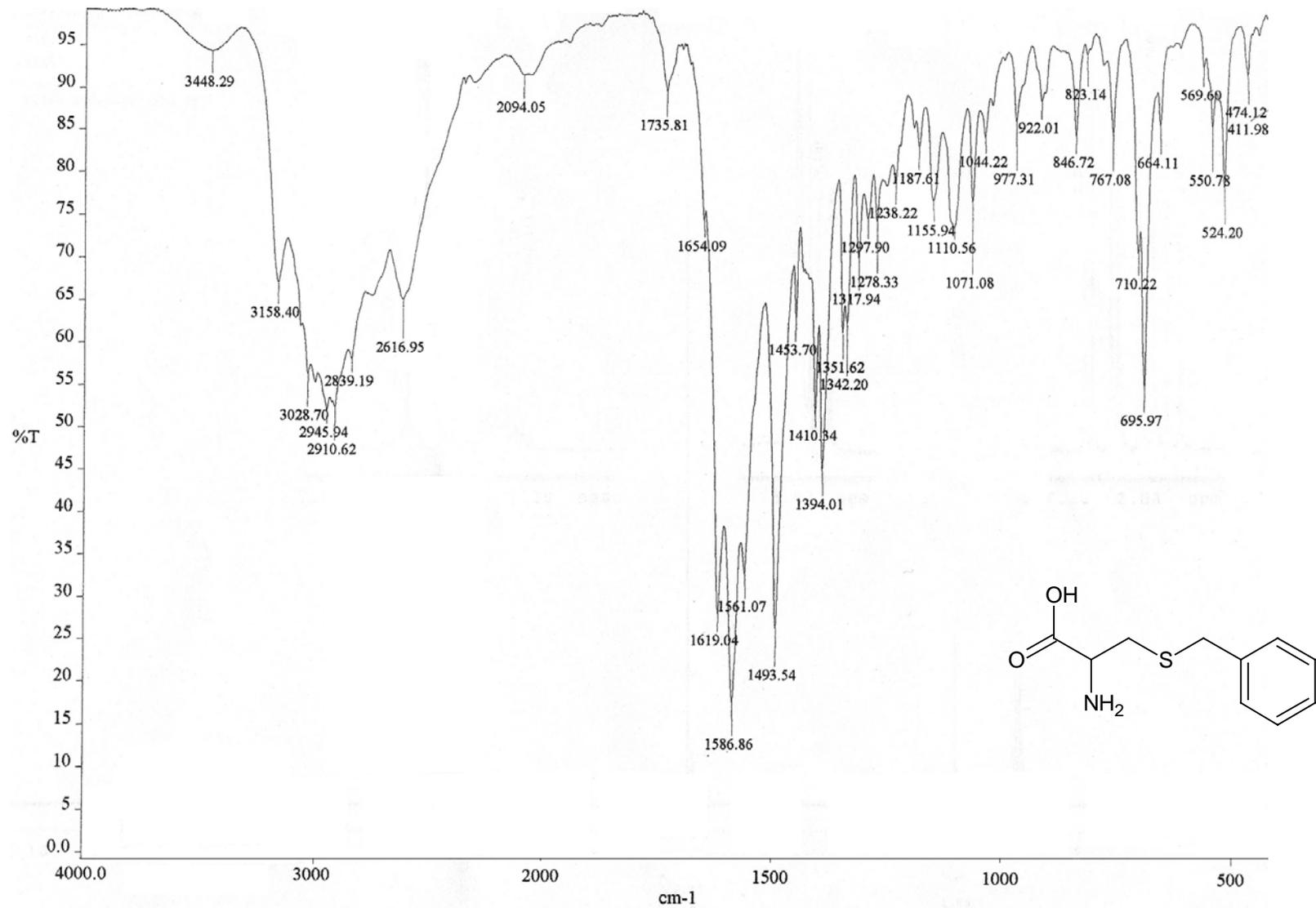


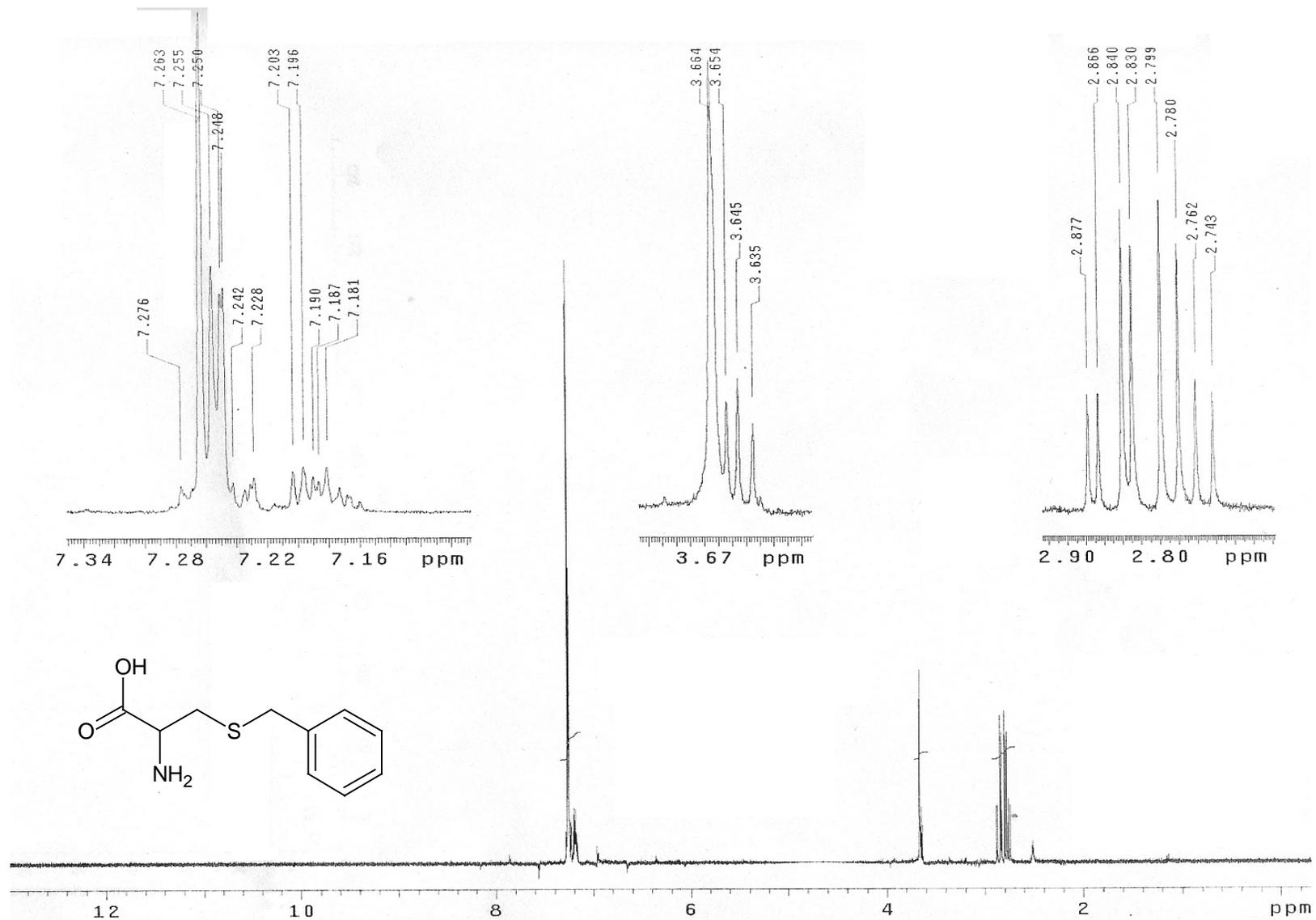
Espectro 3. EM, SAC.





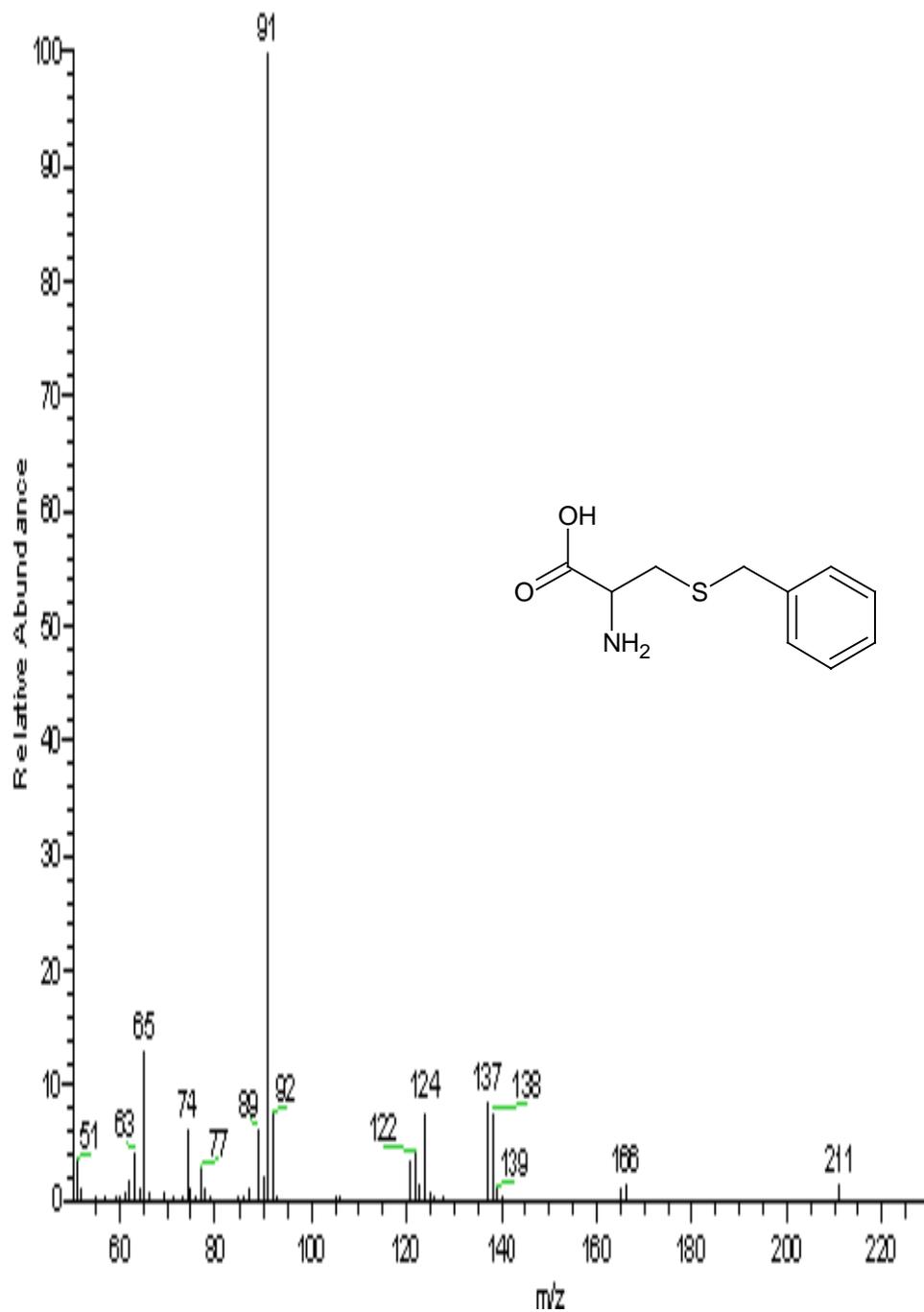
Espectro 4. IR, SBC.



Espectro 5. RMN<sup>1</sup>H, SBC.

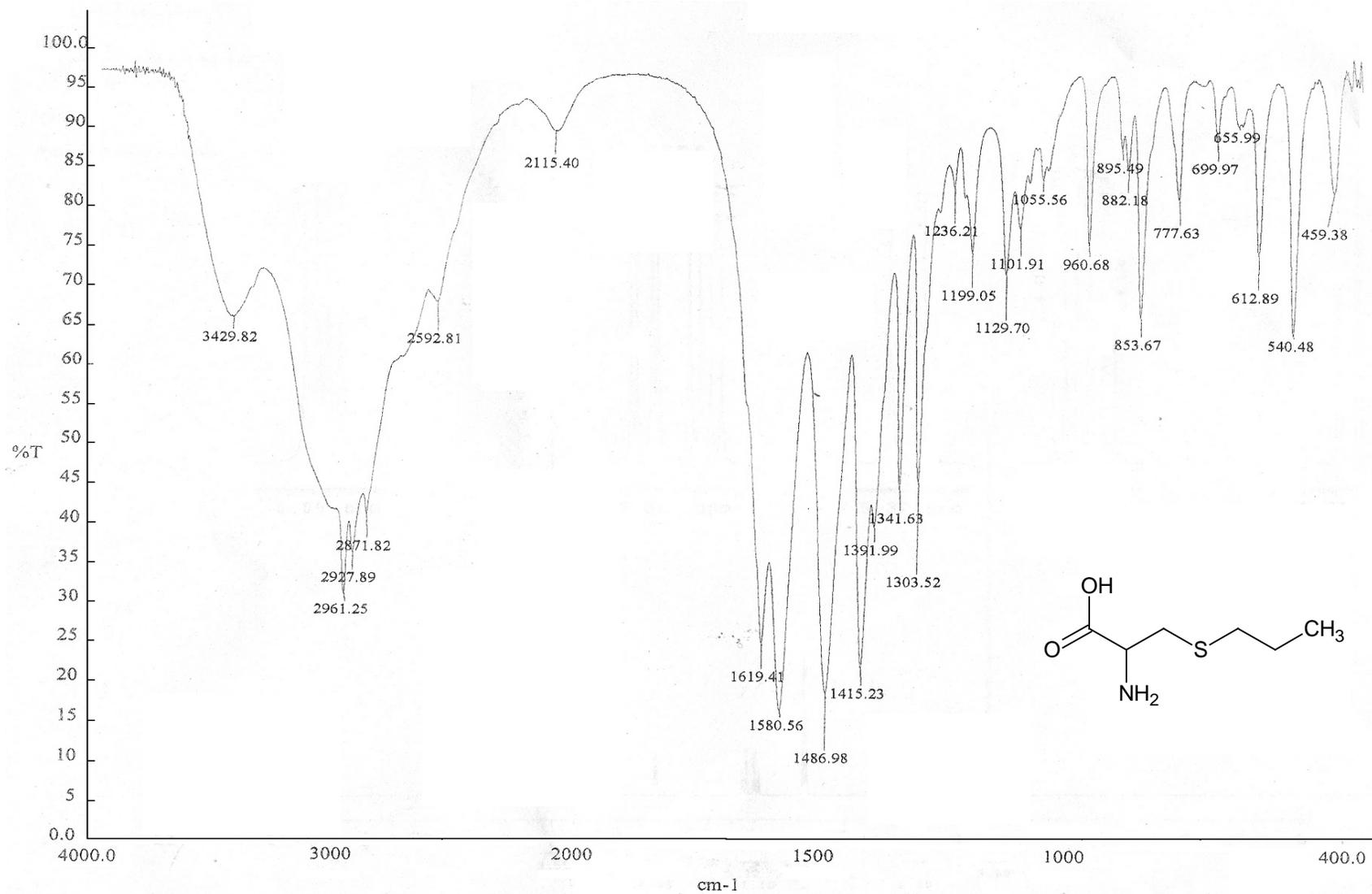


Espectro 6. EM, SBC.



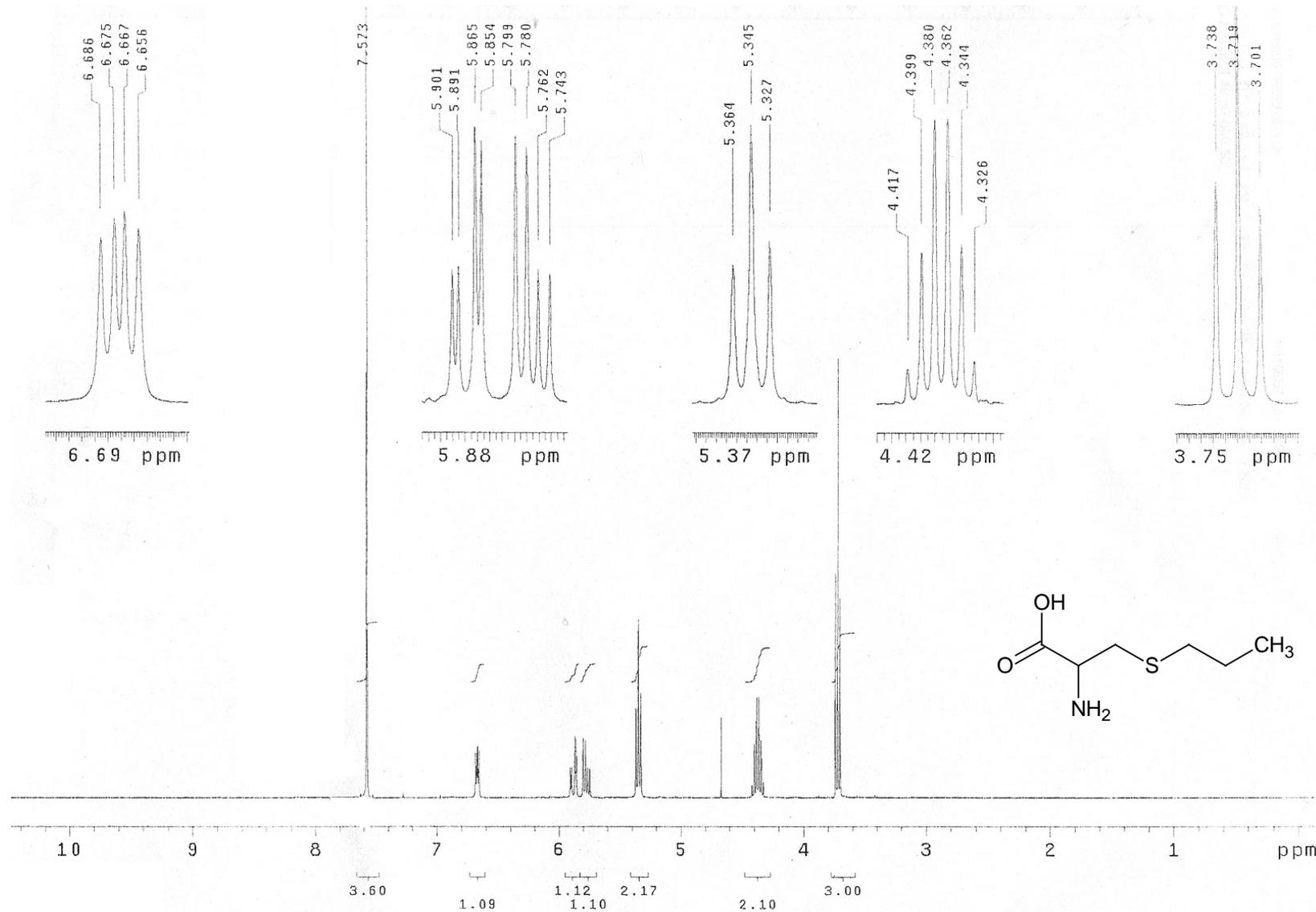


Espectro 7. IR, SPC.





Espectro 8. RMN<sup>1</sup>H, SPC.





Espectro 9. EM, SPC.

