



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

Efecto antioxidante del jugo de toronja
sobre la lipoperoxidación producida por la
daunorrubicina

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A
CRISTINA VICENTE LEGORRETA

ASESORES: DRA. ROSA ISELA ÁLVAREZ GONZÁLEZ
QFB. LAURA MARTINO ROARO



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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética (L-521) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo I, en la Universidad Nacional Autónoma de México en colaboración con el Laboratorio de Genética del Departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Rosa Isela Álvarez González y de la QFB. Laura Martino Roaro.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis sinodales y asesores:

- Dra. Rosa Isela Álvarez González
- QFB. Laura Martino Roaro
- Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar
- Dra. Sandra Díaz Barriga
- MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza
- Q.F.B. Leticia Zúñiga Ramírez
- MFC. Beatriz de Jesús Maya Monroy

Porque con sus contribuciones se enriqueció este trabajo.

A mi compañera de laboratorio:

- Lolita por sus consejos y accesibilidad.

A la señora Yolanda Pérez Cruz

- A quien también le debo la conclusión de este trabajo.

DEDICATORIAS

El presente trabajo esta dedicado a:

- Mi Madre por su apoyo durante el transcurso de todos estos años, su ánimo, su cariño y principalmente por su paciencia y comprensión.
- Mi Padre quien mas que académicamente, estuvo conmigo en los momentos más difíciles de mi vida.
- Mi Esposo Omar Jahlim por su apoyo incondicional, su confianza, paciencia, ánimo y por ser una pieza importante en la culminación de este trabajo.
- Mi hijo Dante David porque junto con su padre son la razón de mi existencia y superación.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	ii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVO GENERAL.....	3
3. HIPÓTESIS.....	4
4. MARCO TEÓRICO.....	5
4.1 RADICALES LIBRES.....	5
4.1.1 ANTECEDENTES.....	6
4.1.2 DEFINICIÓN.....	6
4.1.3 FUENTES BIOLÓGICAS DE RADICALES LIBRES.....	6
4.1.3.1 PROCESOS ENZIMÁTICOS.....	6
4.1.3.2 PROCESOS INMUNOLÓGICOS.....	7
4.1.3.2.1 FAGOCITOSIS.....	7
4.1.3.2.2 INFLAMACIÓN.....	8
4.1.3.3 ORGANELOS CELULARES.....	9
4.1.4 FUENTES EXTRÍNSECAS DE RADICALES LIBRES.....	10
4.1.5 TOXICIDAD DE LOS RADICALES LIBRES SOBRE LAS BIOMOLÉCULAS.....	11
4.1.5.1 DAÑO SOBRE LOS LÍPIDOS.....	11
4.1.5.2 DAÑO SOBRE LAS PROTEÍNAS.....	12
4.1.5.3 DAÑO SOBRE EL ADN.....	14
4.1.5.3.1 ACCIONES MUTAGÉNICAS.....	14
4.1.5.3.2 ACCIONES CARCINOGENICAS.....	16
4.1.5.4 DAÑO SOBRE LOS CARBOHIDRATOS.....	17
4.2 DAUNORRUBICINA.....	18
4.2.1 FÓRMULA.....	18
4.2.2 USOS TERAPÉUTICOS.....	19
4.2.3 FARMACOCINÉTICA.....	20
4.2.4 MECANISMO DE ACCIÓN.....	22
4.2.4.1 INTERCALACIÓN.....	22
4.2.4.2 ALQUILACIÓN.....	23
4.2.4.3 PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES.....	23
4.2.4.3.1 POR ACCIÓN ENZIMÁTICA.....	23
4.2.4.3.2 POR ACCIÓN DIRECTA.....	23
4.2.4.3.3 POR FORMACIÓN DE COMPLEJOS.....	24
4.3 ANTIOXIDANTES.....	25
4.3.1 DEFINICIÓN.....	25
4.3.2 CLASIFICACIÓN.....	25
4.3.2.1 ENDÓGENOS.....	25
4.3.2.2 EXÓGENOS.....	26

4.3.3	MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES.....	27
4.4	LA TORONJA.....	28
4.4.1	DESCRIPCIÓN GENERAL.....	28
4.4.2	CONSTITUYENTES DEL JUGO DE TORONJA.....	29
4.4.3	ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE LA TORONJA.....	31
4.4.3.1	INHIBICIÓN ENZIMÁTICA.....	31
4.4.3.2	EFFECTOS SOBRE EL ADN.....	32
4.4.3.3	ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES DE LA TORONJA.....	33

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	35
5.2	MATERIALES Y REACTIVOS.....	35
5.3	PROCEDIMIENTO.....	37
5.3.1	EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL JUGO DE TORONJA EN MICROSOMAS DE RATONES IN VIVO	37
5.3.2	OBTENCIÓN DE MICROSOMAS.....	38
5.3.3	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	39
5.3.4	CUANTIFICACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO.....	40
5.3.5	EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL JUGO DE TORONJA IN VITRO.....	41

6. RESULTADOS

6.1	OBTENCIÓN DE MICROSOMAS.....	44
6.2	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	45
6.3	EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL JUGO DE TORONJA IN VIVO.....	47
6.4	EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL JUGO DE TORONJA IN VITRO.....	51

7. DISCUSIÓN.....

54

8. CONCLUSIONES.....

62

9. REFERENCIAS.....

63

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Producción de radicales libres durante la fagocitosis.
- Figura 2. Reacción de Haber – Weiss.
- Figura 3. Lipoperoxidación del ácido linoléico.
- Figura 4. Formas normales y oxidadas de las bases nitrogenadas.
- Figura 5. Estructura química de la daunorrubicina.
- Figura 6. Principales rutas metabólicas de la daunorrubicina en humanos.
- Figura 7. Daunorrubicina intercalada entre pares de bases adyacentes del ADN.
- Figura 8. Complejo formado entre la daunorrubicina y el hierro (III).
- Figura 9. Clasificación de los antioxidantes.
- Figura 10. Distribución de los grupos experimentales.
- Figura 11. Distribución de los sistemas in vitro.
- Figura 12. Promedio de las concentraciones de proteínas totales en cada uno de los grupos experimentales tratados con agua, daunorrubicina (DAU), jugo de toronja (JT) y sus combinaciones.
- Figura 13. Lipoeroxidación producida por el jugo de toronja sobre microsomas hepáticos de ratones tratados con jugo de toronja (JT), agua y daunorrubicina (DAU).
- Figura 14. Efecto del agua, la daunorrubicina (DAU) y del jugo de toronja (JT) sobre la concentración del malondialdehído derivado de la lipoperoxidación in vivo.
- Figura 15. Efecto del agua, daunorrubicina (DAU) y jugo de toronja (JT) sobre la concentración de malondialdehído derivado de la lipoperoxidación en microsomas hepáticos in vitro.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
$\cdot\text{O}_2^-$	anión superóxido
KCl	cloruro de potasio
DAU	daunorrubicina
ERO	especies reactivas de oxígeno
Fe/Asc	hierro (II) – ácido ascórbico
NADPH	fosfato reducido de nicotinamida adenindinucleótico
g	gramos
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JT	jugo de toronja
MDA	malondialdehído
Me(III)	ion metálico de cobre o hierro
μg	microgramos
μL	microlitros
mL	mililitros
mM	milimolar
nm	nanómetros
ppm	partes por millón
H_2O_2	peróxido de hidrógeno
$\cdot\text{OH}$	radical hidroxilo
RL	radicales libres
rpm	revoluciones por minuto
TBARS	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TEP	1,1,2,3-tetraetoxipropano
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano

1. INTRODUCCIÓN

Los seres humanos estamos expuestos a los radicales libres diariamente y su acción se equilibra con la participación de antioxidantes endógenos y exógenos, sin embargo, cuando el sistema antioxidante del organismo no es suficiente para reaccionar con grandes cantidades de radicales libres, se origina un aumento en su concentración dentro del organismo. Bajo esta condición, los radicales libres provocan daño oxidativo sobre las biomoléculas por lo que están involucrados en el envejecimiento celular y en el desarrollo de enfermedades que afectan los aparatos cardiovascular, urinario, ocular, respiratorio y el sistema nervioso (Dorado y Revilla, 2000; Freeman y Crapo, 1982; García y cols., 2001, Pita y cols., 2000, Rodríguez y cols., 2001).

Diversas investigaciones han sugerido que el consumo de frutas y verduras disminuye la frecuencia de enfermedades relacionadas con el daño oxidativo debido a su alto contenido en antioxidantes, por lo que en este proyecto se evaluó el efecto antioxidante del jugo de toronja, puesto que existen evidencias de que algunos de sus componentes en forma aislada (por ejemplo los flavonoides) muestran capacidad antioxidante (Heijnen y cols., 2002; Pineda y cols., 1999). En particular, acerca de la naringina existe un número de investigaciones que han demostrado dicha capacidad (Jeon y cols., 2001). Además el jugo de toronja está compuesto de vitaminas E, C y D, las cuales se caracterizan por neutralizar la acción de los radicales libres y por lo cual son considerados como los principales antioxidantes de los alimentos (Pineda y cols., 1999; Quiles y cols., 2002). Por otro lado el jugo de toronja contiene minerales que son cofactores de las enzimas antioxidantes del organismo humano por lo que es necesario consumirlos (Álvarez, 2004; Quiles y cols., 2002).

Aunque a algunos de los componentes aislados de la toronja se les ha demostrado su capacidad antioxidante, esta evidencia no es suficiente para conocer con certeza la capacidad antioxidante total del jugo debido a las interacciones que puedan establecerse entre los antioxidantes y otros de sus componentes.

Con respecto a la capacidad antioxidante del jugo de toronja completo existen muy pocos estudios *in vitro* e *in vivo* (Álvarez, 2004).

Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende evaluar su potencial antioxidante *in vivo* mediante la inhibición de la lipoperoxidación producida por la daunorrubicina (DAU), cuyo metabolismo produce los RL que tienen efectos directos o indirectos sobre los lípidos membranales microsomales hepáticos e *in vitro* mediante la inhibición de la lipoperoxidación inducida por el sistema constituido por hierro (II) – ácido ascórbico, ya que la oxidación del metal y su regeneración mediada por el ácido ascórbico a bajas concentraciones, producen los radicales libres que atacan los lípidos microsomales.

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antioxidante del jugo de toronja mediante el ensayo de lipoperoxidación inducida por la daunorrubicina en microsomas hepáticos de ratón in vivo, así como en un sistema microsomal in vitro induciendo la lipoperoxidación por medio del complejo hierro (II) – ácido ascórbico, utilizando la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico para determinar si el jugo de toronja disminuye la oxidación en ambos sistemas.

3. HIPÓTESIS

Si algunos de los componentes del jugo de toronja en su forma aislada tienen la capacidad de comportarse como antioxidantes, entonces el jugo de toronja completo protegerá a los lípidos del daño producido por los radicales libres derivados tanto del metabolismo de la daunorrubicina como los producidos por el sistema hierro (II) – ácido ascórbico, disminuyendo la concentración de malondialdehído.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 RADICALES LIBRES

4.1.1 ANTECEDENTES

En 1900, Gomberg demostró la existencia de los radicales libres (RL) por primera vez, cuando publicó un artículo titulado "Un ejemplo de carbono trivalente: trifenil", donde describió la descomposición del hexafeniletano en dos RL trifenil (Bergendi y cols., 1999; Niki, 2000). En la década de los treinta, Mayo y Kharasch descubrieron que la adición de bromuro de hidrógeno a un doble enlace en presencia de peróxido de benzoilo, generaba productos no esperados por la regla de Markovnikov, la cual dice que "en las adiciones de halogenuros de hidrógeno a alquenos asimétricos, el protón del halogenuro de hidrógeno se une al carbono del doble enlace que ya tenga el mayor número de hidrógenos", y más tarde junto con Walling explicaron que la razón por la cual se daba una adición antiMarkovnikov, era una reacción que procede por un mecanismo en cadena, mediada por RL (Fessenden y Fessenden, 1983; Niki, 2000).

La importancia de los RL sobre los organismos vivos al igual que en el campo de la bioquímica, inicialmente recibió poca atención, pero con el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa, aumentó el interés acerca del papel de los RL y las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Niki, 2000; García y cols., 2001).

4.1.2 DEFINICIÓN

Un radical libre se define como un átomo o molécula que contiene uno o más electrones no apareados en su último orbital, además es extremadamente reactivo debido a la necesidad de adquirir un electrón adicional para lograr estabilidad, por lo tanto es de vida efímera y es capaz de combinarse inespecíficamente con otras moléculas (Bergendi y cols., 1999; Dorado y Revilla, 2000; Fessenden y Fessenden, 1983; Niki, 2000; Ng y cols., 2000; Rodríguez y cols., 2001).

4.1.3 FUENTES BIOLÓGICAS DE RADICALES LIBRES

En el funcionamiento normal del organismo existen varios procesos biológicos que son indispensables para los seres vivos, los cuales involucran a los RL. Ejemplos de estos procesos son los siguientes (Freeman y Crapo, 1982).

4.1.3.1 Procesos enzimáticos.

Muchas enzimas del grupo de las óxido-reductasas generan RL durante su ciclo catalítico, entre ellas la xantina oxidasa, (flavoproteína que contiene molibdeno) su función es catalizar la pérdida de hidrógeno de las bases púricas utilizando la reducción del oxígeno (O_2) y generando como productos al ácido úrico, al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al anión superóxido ($^{\ominus}O_2^{\cdot}$) (Freeman y Crapo, 1982; Mayes, 1988).

Otra enzima óxido-reductasa es la aldehído deshidrogenasa (metaloflavoproteína que contiene molibdeno y hierro), actúa sobre aldehídos y substratos N-heterocíclicos formando H_2O_2 como producto (Freeman y Crapo, 1982; Mayes, 1988) .

Entre los mecanismos de oxidación-reducción de estas flavoproteínas, se destaca la reducción del anillo isoaloxacina en los nucleótidos de flavina por la vía de una semiquinona intermediaria (el cual es un radical libre) (Dorado y Revilla, 2000).

4.1.3.2 Procesos inmunológicos

4.1.3.2.1 Fagocitosis

Los leucocitos polimorfonucleares generan RL mediante un aumento del metabolismo para destruir los microorganismos fagocitados (Dorado y Revilla, 2000).

En las membranas del fagocito, el aumento del metabolismo activa la enzima NADPH-oxidasa, la cual cataliza la reacción entre el oxígeno y el NADPH⁺ que proviene de la vía glucolítica (Figura 1) para formar anión superóxido (O_2^-) quien

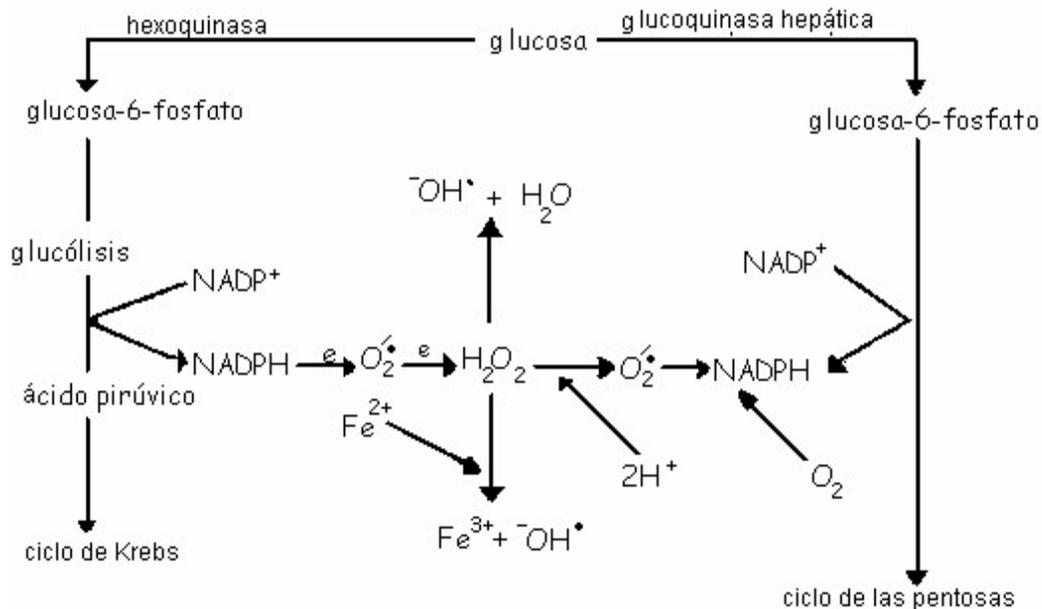


Figura 1. Producción de radicales libres durante la fagocitosis.

por ganancia de un electrón y por acción de la enzima superóxido dismutasa forma

H₂O₂ que es importante porque: a) por ganancia de un electrón y un protón origina (radical hidroxilo) $\cdot\text{OH}$ y b) En presencia de metales produce $\cdot\text{OH}$ y por interacción con $\cdot\text{O}_2$ se regenera el metal, iniciándose nuevamente la reacción (ciclo de Haber-Weiss, Figura 2) (Álvarez, 2000; Cariño, 2002; Dorado y Revilla, 2000).

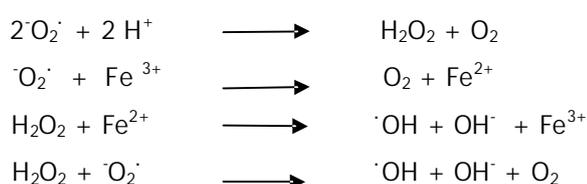


Figura 2. Reacción de Haber-Weiss.

La formación de hipoclorito (ClO^-) por la reacción del H₂O₂ con iones cloruro, y por otra parte, la producción de agentes oxidantes como el óxido nítrico (NO), nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) derivados de los aminoácidos, son agentes que contribuyen en la destrucción de los microorganismos (Bergendi y cols., 1999).

4.1.3.2.1 Inflamación

En esta etapa, la producción de RL se realiza en las membranas microsomales y plasmáticas, a las cuales se asocian enzimas como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, quienes intervienen en el metabolismo eicosanoide, donde derivan RL intermediarios para llegar a la producción de las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, así como sustancias anafilácticas de baja potencia (Freeman y Crapo, 1982; Rodríguez y cols. 2001).

4.1.3.3 Organelos celulares

La mitocondria constituye la principal fuente de RL, lo cual se lleva a cabo a nivel de la cadena respiratoria, que es la etapa de generación de energía en forma de trifosfato de adenosina, en donde el oxígeno es el aceptor final de electrones. Debido a que el sistema no es perfecto, libera iones O_2^- cuya dismutación conduce a la formación de H_2O_2 . En este nivel, principalmente la región ubiquinona-citocromo b es el sitio de mayor producción de iones O_2^- (Rodríguez y cols., 2001).

Una consecuencia directa de este proceso es que, entre los nutrientes iniciales a partir de los cuales se obtendrá energía y el proceso final, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación, algunas de las cuales pueden entregar 1 o 2 electrones y así producir los intermediarios parcialmente reducidos que son los RL (Freeman y Crapo, 1982).

El retículo endoplásmico y la membrana nuclear son membranas que contienen citocromo P450 y b5 las cuales pueden oxidar ácidos grasos y xenobióticos, y reducir el oxígeno, entre otras sustancias con la consecuente formación de RL. Por otra parte los citocromos pueden formar O_2^- por auto-oxidación o bien, formarán H_2O_2 por disociación de complejos peroxi-citocromo (Freeman y Crapo, 1982; Rodríguez y cols., 2001).

Los peroxisomas son muy ricos en oxidasas y generan O_2^- como intermediario de la producción de H_2O_2 (Freeman y Crapo, 1982; Rodríguez y cols., 2001).

4.1.4 FUENTES EXTRÍNSECAS DE RADICALES LIBRES

Si bien el desarrollo científico, tecnológico e industrial ha favorecido las condiciones de vida, también ha propiciado la contaminación industrial y atmosférica, originando fuentes de RL, tales como:

- Los factores físicos como la luz ultravioleta y visible, el calor, las radiaciones ionizantes α , β , γ y los rayos c , que producen iones, moléculas excitadas y RL (Fessenden y Fessenden, 1983; Freeman y Crapo, 1982).
- Los factores químicos como los oxidantes fuertes, por ejemplo el H_2O_2 que contienen los tintes para cabello y el ácido nitroso (HNO_2) que es liberado con el ácido estomacal al ingerir embutidos y alimentos procesados. Además, en la contaminación atmosférica y principalmente en el humo del cigarro, se liberan grandes cantidades de sustancias oxidantes que producen RL. Por otro lado, los herbicidas, pesticidas, algunos solventes, anestésicos e hidrocarburos policíclicos originan los RL o especies reactivas de oxígeno que podemos llegar a ingerir o inhalar (Álvarez, 2000).
- El tratamiento con medicamentos tales como los antibióticos antineoplásicos antracíclicos es otra fuente de RL, puesto que dependen de grupos unidos a metales para su actividad siendo capaces de generar radicales oxígeno ($\cdot O_2$, H_2O_2 , $\cdot OH$). Entre estos medicamentos se cita a la adriamicina, DAU, doxorubicina y otros antibióticos (Miura y cols., 1994; Rodríguez y cols., 2001).
- Los factores orgánicos y metabólicos como la dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, procesos inflamatorios producidos por microorganismos extraños así como por traumatismos, fenómenos de

isquemia-reperfusión y ejercicios extenuantes, son procesos que enlazan la influencia extrínseca con la producción intrínseca de RL debido a la respuesta normal del organismo a tales condiciones (Jeon y cols., 2002; Rodríguez y cols., 2001).

4.1.5 TOXICIDAD DE LOS RADICALES LIBRES SOBRE LAS BIOMOLÉCULAS

Como se mencionó anteriormente, los RL son entidades químicas altamente reactivas, por lo que en su labor de captación de electrones, atacan cualquier molécula que se encuentre a su alrededor, siendo los lípidos, los ácidos nucleicos, las proteínas y los carbohidratos, las biomoléculas afectadas dentro del organismo, en una situación de estrés oxidativo (Rodríguez y cols., 2001, Niki, 2000).

4.1.5.1 Daño sobre los lípidos

La toxicidad de los RL sobre los lípidos ocurre generalmente al oxidarlos (lipoperoxidación) y se lleva a cabo principalmente en la membrana plasmática, debido a su composición química rica en fosfolípidos, glicéridos, glucolípidos y esteroides (Freeman y Crapo, 1982; Álvarez, 2002; Rodríguez y cols., 2001).

Además de los lípidos membranales, los RL pueden oxidar el colesterol, cuyos derivados se pueden ir acumulando en el endotelio, lo que los relaciona directamente con las enfermedades coronarias (Jeon y cols., 2001; Meagher y Fitzgerald, 2000).

Adicional al daño oxidativo de los lípidos, la lipoperoxidación trae consecuencias mutagénicas y carcinogénicas, la iniciación de procesos inmunológicos como la inflamación, inactivación de algunas enzimas o la iniciación de la transcripción de genes, conduciendo a la muerte celular programada (apoptosis) (Niki,2000).

En general en los procesos de oxidación lipídica, un RL toma un hidrógeno del ácido graso para dar lugar a la formación de un nuevo radical orgánico (iniciación). Este radical orgánico, en busca de una pareja para su electrón, ataca el lípido vecino y da lugar a un nuevo radical, y así sucesivamente (propagación), generando una reacción en cadena. Lo anterior se ejemplifica con la lipoperoxidación del ácido linoléico en la figura 3 (Cariño, 2002; Dorado y Revilla, 2000; Moore y Roberts, 1998).

Como consecuencia, la lipoperoxidación genera un gran número de subproductos y productos de degradación, tales como peróxidos, radicales alcoxi, radicales oxígeno, aldehídos reactivos, entre otros. Algunos de los cuales tienen efectos tóxicos sobre otras biomoléculas, con lo cual amplifican el daño. Sin embargo, el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal se destacan como los productos más tóxicos de la lipoperoxidación (Marnett, 2000; Moore y Roberts, 1998).

4.1.5.2 Daño sobre proteínas

Los aminoácidos que constituyen las proteínas, tales como el triptófano, tirosina, alanina, histidina, metionina o cisteína pueden ser los principales blancos de la oxidación por los RL. Como consecuencia, se producen entrecruzamientos de cadenas peptídicas, formación de dímeros, grandes agregados proteicos, fragmentación proteica y/o alteración de su función debido a la formación de

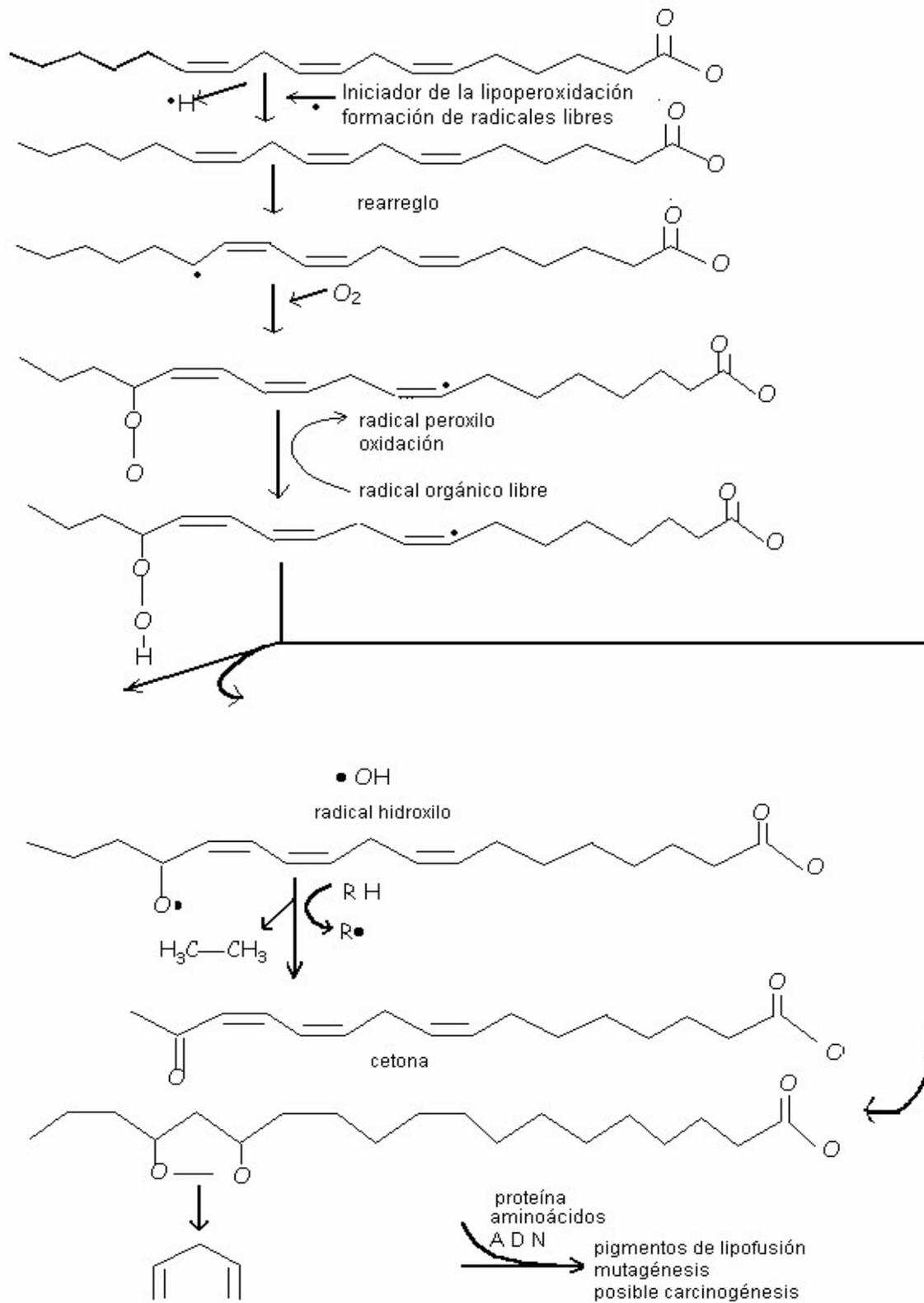


Figura 3. Lipoperoxidación del ácido linoléico.

grupos carbonilo en los aminoácidos indispensables para su actividad. Entre las proteínas afectadas se incluyen las enzimas, transportadores iónicos membranales, receptores y mensajeros celulares. Así como proteínas reparadoras de oncogenes y proteínas supresoras, las cuales están involucradas en procesos carcinogénicos (Dorado y Revilla, 2000; Freeman y Crapo, 1982; Rodríguez y cols., 2001).

El envejecimiento es una consecuencia del daño a las proteínas, en el que los RL reaccionan con las células del tejido colágeno tomando sus electrones, como resultado, las fibras de colágeno pierden su elasticidad por lo que la piel se observa seca y arrugada (Kanno y cols., 2003).

4.1.5.3 Daño sobre el ADN

4.1.5.3.1 Acciones mutagénicas

Independientemente del origen de los RL, la toxicidad que ejercen sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN) es diversa. Por ejemplo, las radiaciones originan la despolimerización de la molécula (Rodríguez y cols., 2001).

Las acciones tóxicas más severas son causadas por el radical $\cdot\text{OH}$. El $\cdot\text{OH}$ reacciona con la desoxirribosa del ADN para derivar radicales desoxirribosa lo que permite la liberación de bases nitrogenadas dejando sitios vacíos que a su vez dan paso al rompimiento de las cadenas de ADN. Por otro lado, el $\cdot\text{OH}$ reacciona con las bases nitrogenadas formando productos oxidados (Figura 4), de los cuales el

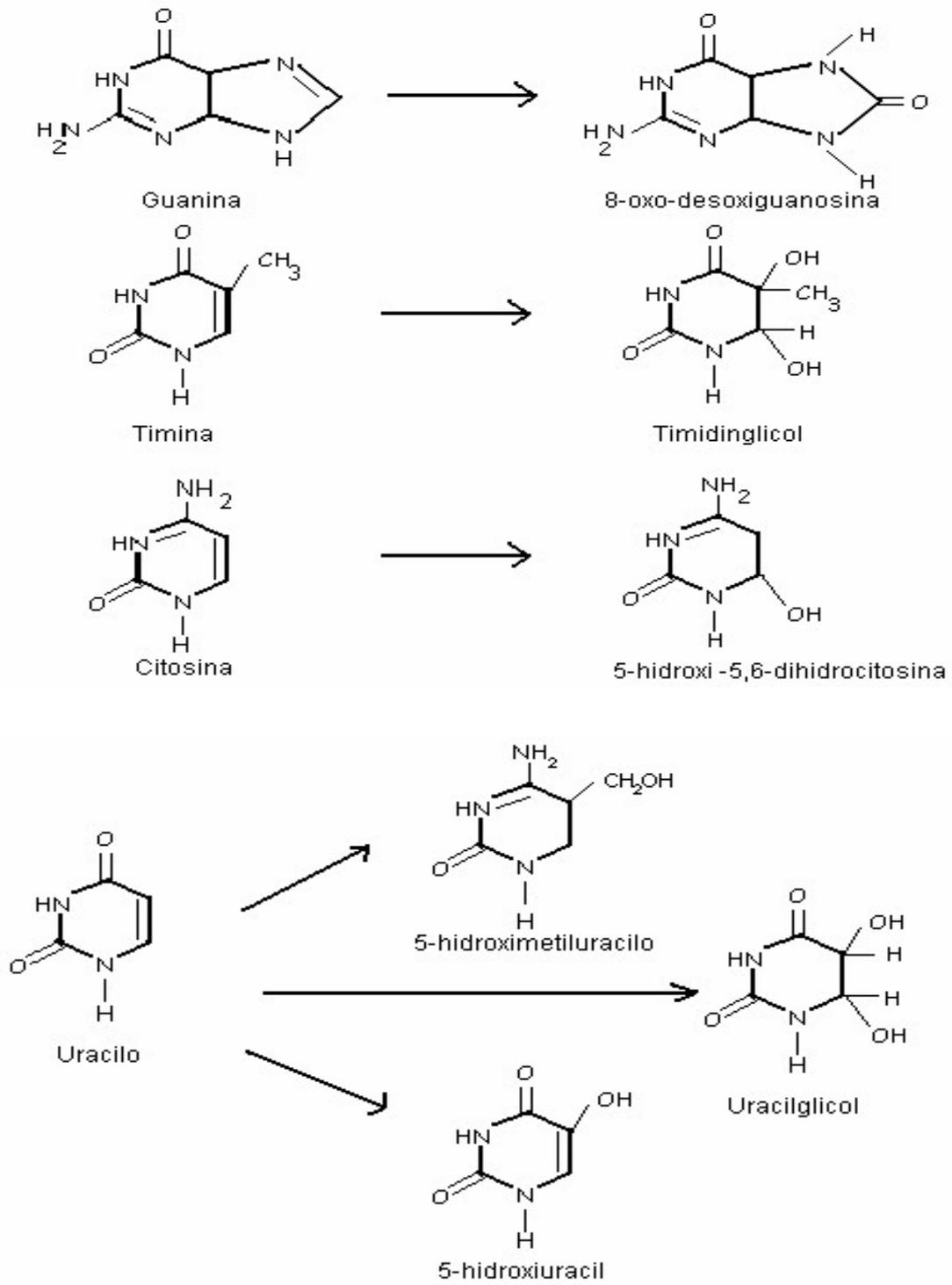


Figura 4. Formas normales y oxidadas de las bases nitrogenadas.

8-oxo-desoxiguanosina tiene mayor importancia por causar transversiones (Marnett, 2000).

Estas acciones sobre el ADN ocasionan la mutación de los genes, su pérdida o solamente la pérdida de su expresión, lo que conduce a la muerte celular e incluso a enfermedades genéticas (Carño, 2002; Marnett, 2000; Rodríguez y cols., 2001).

4.1.5.3.2 Acciones carcinogénicas

Las acciones mutagénicas causadas por los RL, las ERO o los derivados del daño a otras biomoléculas pueden conducir a carcinogénesis, cuando la mutación se lleva a cabo en los oncogenes, o cuando el daño de los RL se da sobre proteínas que frenan tales genes (oncosupresores) (Rodríguez y cols., 2001).

Además, los RL o subproductos derivados de los procesos oxidativos de las biomoléculas, contribuyen al crecimiento anormal de las células, al perder su capacidad de "reconocer" las células vecinas, lo que permite la proliferación celular, fenómeno característico en los tumores benignos o malignos (cáncer) (Marnett, 2000).

Es importante recalcar que el malondialdehído es el derivado de la lipoperoxidación al cual se le ha demostrado su capacidad mutagénica en mamíferos.

4.1.5.4 Daño sobre carbohidratos

Las reacciones de los carbohidratos con los RL, producen cambios en las glicoproteínas transmembranales, las cuales son receptoras de la superficie celular perdiendo así su función. Por otra parte, los RL causan despolimerización en el ácido hialurónico, carbohidrato necesario para mantener la viscosidad del fluido sinovial de las articulaciones y oxidan los azúcares de los ácidos nucleicos con graves consecuencias (Álvarez, 2002; Dorado y Revilla, 2000; Freeman y Crapo, 1982).

4.2 DAUNORRUBICINA

El antibiótico antineoplásico antracíclico, la daunorrubicina, llamado también como daunoblastina, daunomicina, daunoblastina, rubidomicina, leucaemomicina C, cerubidina y ruididomicina (Merck, 1996), fue aislado y estudiado por primera vez por Cassinelly y Orezzi a principios de 1960 en los laboratorios de Farmitalia (Italia), a partir de cultivos de *Streptomyces peucetius*. La DAU pertenece a un grupo de productos bacterianos coloridos conocidos como rodamicinas (Gewirtz, 1999; Quiles y cols., 2002; Marián y Matkovics, 1982).

4.2.1 FÓRMULA

La nomenclatura de la DAU dada por la IUPAC es la siguiente: (8S-cis)-8- acetil-10-[(3 – amino –2,-3, 6-trideoxi-1 –metoxi –5, 12-naftacenediona.

Su fórmula condensada es $C_{27}H_{29}NO_{10}$ y tiene un peso molecular de 527.53 g / mol (Merck, 1996).

La DAU es un glucósido que se caracteriza por tener cuatro anillos en su estructura química (Figura 5), lo que se denomina núcleo antraquinona, que conforma la aglucona pigmentada o cromófora, conocida como daunomicinona.

Por medio de un enlace glucosídico se une a un aminoazúcar, la daunosamina. Desde el punto de vista químico se clasifica dentro del grupo de las antraciclinas (Calabresi y Chabner, 1991; Gewirtz, 1999; Shadle y cols., 2000).

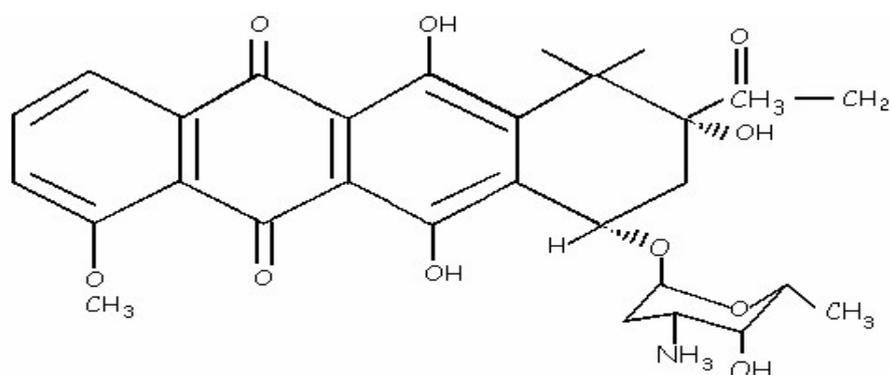


Figura 5. Estructura química de la daunorrubicina.

Por la estructura quinona – hidroquinona de sus anillos puede actuar como agente receptor- donador de electrones (Cariño, 2002).

4.2.2 USOS TERAPÉUTICOS.

La DAU es un antineoplásico utilizado en el tratamiento de la leucemia linfocítica y la granulocítica agudas, y también se cuenta entre los fármacos más activos para tratar la leucemia no linfoblástica aguda. Posee gran actividad contra tumores sólidos y linfomas en niños, a diferencia de en los adultos, en quienes la actividad contra dichas neoplasias es mínima. Sin embargo, esencialmente se utiliza en el tratamiento de las leucemias mieloide y linfoblástica agudas (Choe y cols., 2001; Gewirtz, 1999; Quiles y cols., 2002).

4.2.3 FARMACOCINÉTICA.

La DAU se absorbe poco en el tubo digestivo, se absorbe bien por vía subcutánea o intramuscular, sin embargo, debido a su acción irritante se administra por vía intravenosa. En la sangre se distribuye a todos los órganos, especialmente al pulmón, al riñón, al hígado y al músculo cardíaco, sin atravesar hacia el líquido cefalorraquídeo. En el organismo sufre biotransformaciones en el hígado y el riñón principalmente. La DAU es reducida por las aldo-reductasas a daunorrubicinol, un agente citotóxico activo, luego, por hidrólisis da lugar a agluconas inactivas y al aminoazúcar. Las agluconas son demetiladas, conjugadas y excretadas en la bilis y en la orina confiriéndole un color rojo (la figura 6 muestra el metabolismo de la daunorrubicina) (Calabresi y Chabner, 1991)

Entre las manifestaciones tóxicas de la DAU está la depresión de la médula ósea, estomatitis, alopecia, disturbios gastrointestinales y manifestaciones dermatológicas, sin embargo la citotoxicidad sobre el corazón es muy importante, caracterizándose por taquicardia, arritmia, disnea, hipotensión, derrame pericárdico e insuficiencia congestiva (Calabresi y Chabner, 1991; Quiles y cols., 2002; Keizer, 1990).

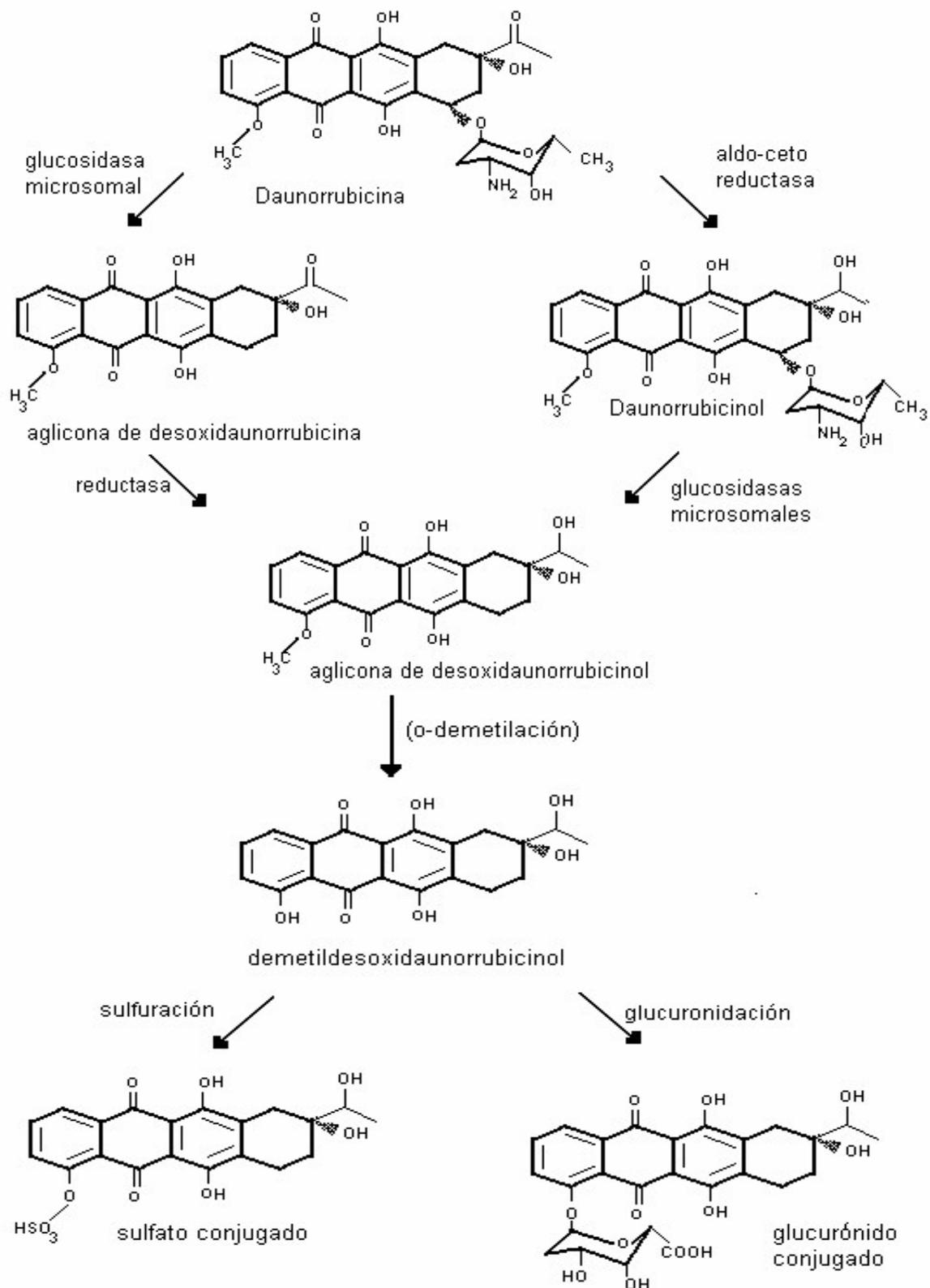


Figura 6. Principales rutas metabólicas de la daunorubicina en humanos.

4.2.4 MECANISMO DE ACCIÓN

4.2.4.1 Intercalación

La aglucona de la DAU se intercala entre los pares de bases adyacentes de la doble hélice del ADN como lo muestra la figura 7. Al intercalarse, distorsiona la estructura del ADN evitando su enrollamiento y plegamiento (Lazo y Larner, 1994; Gewirtz, 1999).

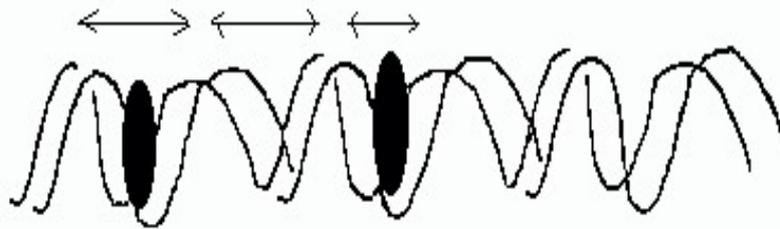


Figura 7. Daunorrubicina intercalada entre pares de bases adyacentes del ADN.

Luego la daunorrubicina intercalada, el ADN y la topoisomerasa II, forman un complejo ternario unido covalentemente, impidiendo la duplicación del ADN. Este complejo impide la acción enzimática de la ARNpolimerasa, inhibiéndose la traducción, siendo ésta última acción la que conduce a la célula a su muerte (Lazo y Larner, 1994; Gewirtz, 1999). Además, en el ADN intercalado, la DAU produce rupturas en los filamentos como ocurre en los intercambios de cromátidas hermanas y se piensa que la topoisomerasa II es capaz de mediar estas rupturas (Cariño, 2002; Shadle y cols., 2000).

4.2.4.2 Alquilación

La alquilación se da cuando la DAU se convierte en C7-desoxiaglicona en ausencia de oxígeno, cuyo tautómero, la C7-metilquinona es un agente alquilante de ADN (Cariño, 2002; Keizer y cols., 1990).

4.2.4.3 Producción de radicales libres

4.2.4.3.1 Por acción enzimática.

La estructura quinona de la DAU, es el sustrato de la xantina oxidasa y la NADPH-citocromo P450 reductasa, por lo que la quinona se reduce a un RL semiquinona que en presencia de oxígeno, donará su electrón extra al O_2 generando $\cdot O_2^-$ y la quinona precursora como productos (Jeon y cols., 2001; Keizer y cols., 1990; Mimnaugh y cols., 1985; Shadle y cols., 2000).

4.2.4.3.2 Por acción directa.

La acción directa de la DAU se lleva a cabo sobre las membranas celulares, cuando entran en contacto con la DAU y por lo tanto causan lipoperoxidación, que a su vez genera otros RL y productos de degradación tóxicos (Laurent y Jaffr  zou, 2001; Gewirtz, 1999).

4.2.4.3.3 Por formación de complejos.

La DAU por ser una quinona, forma un complejo con un ion metálico (Me) de hierro metálico (Me) de hierro o cobre, quedando en su estado reducido: DAU-Me(II) que al estar en contacto con O_2 se oxida a DAU-Me(III) (Figura 8) produciendo $\cdot O_2^-$, que a su vez genera H_2O_2 por dismutación y $\cdot OH$ por la reacción de Haber-Weiss (Cariño, 2002; Miura y cols., 1994).

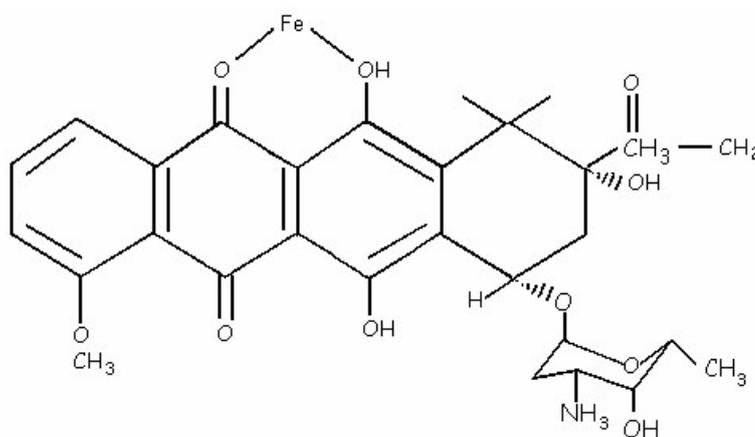


Figura 8. Complejo formado entre la daunorrubicina y el hierro (III).

Otro mecanismo de formación de RL que involucra el complejo Me(III), sin la formación de una semiquinona intermediaria, utiliza la reducción de las enzimas NADPH-citocromo P450 o al glutatión para formar DAU-Me(II), este último reacciona con el O_2 para generar $\cdot O_2^-$ que como sabemos es fuente del H_2O_2 y $\cdot OH$ (Álvarez, 2004; Cariño, 2002).

Los mecanismos anteriores, en conjunto contribuyen a la citotoxicidad de la DAU y a sus acciones terapéuticas y tóxicas en el organismo.

4.3 ANTIOXIDANTES

Una manera de evitar los efectos tóxicos producidos por los RL, es el uso de antioxidantes. En el medio ambiente existe una gran cantidad de antioxidantes, de igual manera en el interior de los organismos, gracias a esto es que, “nuestro cuerpo está luchando contra los RL a cada momento del día” (García y cols., 2001).

4.3.1 DEFINICIÓN

Un antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, e independientemente del mecanismo por el que actúa, inhibe las reacciones de oxidación, sin perder su propia estabilidad. Por ende, inhibe los efectos adversos producidos por los RL sobre los organismos (Bergendi y cols., 1999; Fessenden y Fessenden, 1983; Fraga y Oteiza, 2002; Mayes, 1988; Niki, 2000).

4.3.2 CLASIFICACIÓN

4.3.2.1 Endógenos

Son los antioxidantes que se sintetizan en el organismo y generalmente son de origen proteico: enzimas y metaloproteínas. En el sistema inmune se localiza a la enzima superóxido dismutasa, quien cataliza la dismutación de $\cdot\text{O}_2$ a H_2O_2 ; las

catalasas, cuya función es catalizar la conversión del H_2O_2 hasta H_2O y O_2 , y la enzima glutatión peroxidasa que utiliza la óxido reducción del glutatión a glutatión oxidado, el cual vuelve a su estado reducido por medio de la glutatión reductasa. Tal mecanismo es utilizado en la desintoxicación o eliminación de fármacos o xenobióticos (Freeman y Crapo, 1982; Niki, 2001; Rodríguez y cols., 2001).

Otra enzima antioxidante es la ceruloplasmina que se encuentra en el plasma, protegiendo a los eritrocitos al atrapar iones O_2^- , además, encontramos proteínas plasmáticas como la transferrina, lactoferrina y albúmina, que secuestran al hierro para evitar sus efectos oxidantes. Finalmente, un ejemplo que no hay que pasar por alto, son las enzimas de reparación del ADN, por ejemplo la ADN metil transferasa de la 6-oxometil guanina, cuyo grupo metilo es eliminado, quedando en su forma normal (Freeman y Crapo, 1982; Marnett, 2000).

4.3.2.2 Exógenos

Los antioxidantes de origen exógeno son ingeridos en las frutas y verduras, porque el organismo no los sintetiza. Dentro de este grupo los más estudiados son los tocoferoles y tocotrienoles (a, b, g y d), los cuales poseen actividad vitamínica (vitamina E), el ácido ascórbico o vitamina C, y el b-caroteno o provitamina A, quienes además de su actividad vitamínica ejercen actividad antioxidante. Otros ejemplos lo constituyen algunos compuestos polifenólicos como la quercetina, el ácido tánico, la catequina y la rutina, entre otros. A algunos alimentos se les adicionan antioxidantes durante su fabricación, con antioxidantes, tales como el butil-hidroxianisol, butil-hidroxitolueno, galato de propilo o di-t-bitilhidroquinona, los cuales participan en las reacciones a través de formas de resonancia estabilizadoras de RL (Fennema, 1985; Jeon y cols., 2002; Pino y cols., 2000; Pita y cols., 2000; Proteggente y cols., 2002; Silva y cols., 2002) .

Exógenos	Endógenos	Cofactores
Vitamina E	Glutación	Cobre
Vitamina C	Ubiquinona	Zinc
β-caroteno	Acido tióctico	Manganeso
Flavonoides	Enzimas: Superóxido dismutasa Catalasa Glutación peroxidasa	Hierro
Lycopeno	Lactoferrina	Selenio

Figura 9. Clasificación de los antioxidantes.

4.3.3 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES

La acción de los antioxidantes se lleva a cabo de acuerdo a distintos mecanismos, los cuales se enumeran a continuación:

Los antioxidantes y enzimas pueden inhibir la producción de RL por:

- Mecanismos que previenen la formación de RL: catalasas y peroxidasas (Rodríguez y cols., 2001).
- Mecanismos que eliminan los RL previamente formados, mediante secuestro o atrapamiento: superóxido dismutasa, butil-hidroxianisol, butilhidroxitolueno, vitamina E (Bergendi y cols., 1999; Niki, 2001; Pita, 1997).
- Quelación de metales de transición: transferrina y flavonoides (Heijnen y cols., 2002).
- Rompimiento de cadenas de reacción: vitaminas C y E (Bergendi y cols., 1999; Pita, 1997).
- Capturación de radicales iniciadores: vitamina E (Bergendi y cols., 1999).
- Competencia por los sitios celulares con los metales: zinc (Bergendi y cols., 1999; Fraga y Oteiza, 2002).

4.4 LA TORONJA

4.4.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

La toronja se descubrió en 1750 en las islas Barbados, su origen se explica por una hibridación entre el pummelo (*Citrus grandis*) y un naranjo dulce. Al principio hubo dificultades en la denominación de esta nueva fruta, por un lado los botánicos proponían el nombre de pomelo, pero fueron los comerciantes quienes implantaron el nombre inglés "grapefruit" hacia el año 1800. Traducido literalmente quiere decir "fruto de uvas", para recordar la manera de colocarlas en los puestos del mercado de Jamaica similar a los racimos de uvas, además de que este fruto cuelga de su árbol en pequeños racimos, muy parecido a las uvas (Álvarez, 2002; Barreiro, 1999).

En 1830, la toronja fue reconocida por los botánicos como *Citrus paradisi*, a comienzos del siglo XIX un médico de la flota napoleónica introdujo la toronja en Florida, donde años más tarde, hacia 1850, comenzó su comercialización.

La toronja ingresó en la República Mexicana, hacia 1940 en el área de Loma Bonita, Oaxaca. Sin embargo, hasta la década de los sesenta el cultivo se expandió a otros estados, como Veracruz, Tamaulipas y Nuevo León, sin embargo, en la actualidad, Veracruz es el principal productor de toronja del país (Álvarez, 2004).

Todas las clases de toronjas proceden de Florida, pero en nuestro país se producen la de pulpa blanca variedad Marsh, la pulpa rosa variedad Ruby red, la de pulpa roja variedad Star Ruby y la doble roja variedad Rio red (Barreiro, 1999). Gracias a la variedad de climas en nuestro país y a los diferentes estados

productores, se encuentran toronjas en el mercado durante todo el año (Álvarez, 2002; Barreiro, 1999).

4.4.2 CONSTITUYENTES DE LA TORONJA

A continuación se enlistan algunos de los compuestos químicos que se encuentran en el jugo de toronja.

- ? Aminoácidos: pequeñas cantidades de alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina (Tirillini, 2000).
- ? Carotenoides: b-caroteno (Tirillini, 2000).
- ? Vitaminas: es rico en vitaminas A, C y E, y contiene cantidades menores de vitaminas B1, B2, B3, B5, ácido fólico, biotina, nicotinamida (Tirillini, 2000).
- ? Ácidos: ácidos cítrico, málico e isocítrico (Tirillini, 2000).
- ? Carbohidratos: puede tener glucosa, fructosa, sucrosa o pentosa, según la clase de toronja (Tirillini, 2000).
- ? Ácidos hidroxicinámicos: son el ferúlico, sinápico, p-cumárico y caféico (Mohri y Uesawa, 2001).
- ? Compuestos polifenólicos: furanocumarinas y sus derivados tales como la bergamotina, la 6',7'-dihidroxibergamotina (Tirillini, 2000; Mohri y Uesawa, 2001; Ho y cols., 1999) el aurapteno (Tirillini, 2000) y la umbeliferona, (Dákovic-Suajcer y cols., 1999) bergapteno (Dákovic-Suajcer y cols., 1999; Ho y cols., 2000), además, contiene la flavononas; naringina y hesperedina. La primera es importante porque

diferencia a la toronja de los demás frutos cítricos, contribuyendo con su sabor amargo (Ho y cols., 2000; Tian y cols., 2002; Borradaile y cols., 2003).

- ? Terpenos: el jugo intacto normalmente no contiene limoneno pero contiene el anillo lactona del ácido limonóico, el cual es convertido gradualmente a limoneno el cual contribuye al sabor amargo del jugo, contiene limonoides por ejemplo: 17-O-β-D-glucopiranosido nomilínico y ácido 17-O-B-D-glucopiranosido obacunóico y en menores concentraciones ácidos nomilíno, nomilínico e ichangina, los cuales contribuyen también al sabor amargo del jugo (Tirillini, 2000).
- ? Minerales: Manganeso, zinc, cobre y fierro. Es uno de los frutos más ricos en potasio, también contiene pequeñas cantidades de sodio, calcio, magnesio, níquel, cromo y fósforo (Gorinstein y cols., 2001).

La cáscara del fruto contiene pectina, aceites esenciales, ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, flavonas polimetoxiladas, fenoles glicosilados y limonoides (Gorinstein y cols., 2001).

Las semillas del fruto son los mayores depósitos de limonoides neutrales y ácidos tales como el limoneno, nomileno, deacetilnomileno, obacunona, entre otros (Tirillini, 2000).

4.4.3 ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE LA TORONJA

Los estudios hechos a los extractos de la toronja y de su jugo indican que posee actividades antimicrobianas, antiproliferativas de células cancerígenas, antitumorales, antioxidantes (Tirillini, 2000), antiinflamatorias (Jeon y cols., 2002) y que interacciona con muchos medicamentos (Mohri y Uesawa, 2001). Incluso se probó que la estimulación por medio del olfato durante 15 minutos, tres veces a la semana con el aceite de la toronja, disminuyó el consumo de alimentos por reducción del apetito y aumentó la lipólisis, por lo tanto disminuyó el peso corporal en ratas (Shen y cols., 2005). Se le considera entre los alimentos que pueden disminuir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, debido a su contenido en flavonoides (Sun y cols., 2002).

4.4.3.1 Inhibición enzimática

Se ha sugerido que al consumir jugo de toronja junto con algunos medicamentos, la biodisponibilidad de dichos compuestos se incrementa. La interacción se da con medicamentos tales como la terfenadina, el saquinavir, la ciclosporina, el midazolam, el nifedipino, el diltiazem y el felodipino, entre otros, cuya característica en común es que son sustratos de la isoenzima CYP3A4 del citocromo P450. Se ha propuesto que los principios activos del jugo de toronja que causan tal efecto, son inhibidores de tal isoenzima, sin embargo, Álvarez (2002) demostraron que la naringina, uno de estos flavonoides, ejerció una acción inductora y no una inhibitoria sobre la isoenzima CYP3A en ratón (Dakovic-Suajcer y cols., 1999; Giorgi y cols., 2003; Ho y cols., 2000; Mohri y Uesawa, 2001; Tian y cols., 2002; Tirillini, 2000).

En este sentido, el jugo de toronja puede ser relevante en la quimioprevención y quimioterapia del cáncer que involucre carcinógenos que son activados en el CYP450 (Tirillini, 2000).

4.4.3.2 Efectos sobre el ADN

La antimutagénesis surgió como una medida preventiva de los daños causados por los RL y otros compuestos que atacan al ADN provocando diversas enfermedades incluso cáncer.

Los compuestos con capacidad de reducir el proceso de la mutagénesis independientemente de su mecanismo de acción, se denominan antimutágenos y se les clasifica en dos grandes grupos: desmutágenos, los cuales actúan extracelularmente impidiendo la reacción del mutágeno sobre el material genético y los bioantimutágenos, son aquellos que actúan intracelularmente previniendo el daño al material genético o reparándolo (Cariño, 2002).

Gracias a que el jugo de toronja está compuesto por diversas sustancias, las cuales se ha demostrado que poseen capacidad antimutagénica como la naringina (Jagetia y Reddy, 2002), vitamina C (Quiles y cols., 2002), bergamotina (Ho y cols., 2000) entre otras, y que actúan a través de diversos mecanismos de acción (Álvarez, 2004), se ha propuesto que el jugo de toronja completo puede actuar como un antimutágeno, al respecto, el jugo de toronja protegió al ADN del daño producido por la aflatoxina B1 (Miyata y cols., 2004). Además, Álvarez (2004) concluyó que el jugo de toronja completo es antimutagénico al inhibir la genotoxicidad producida por la DAU y la ifosfamida en ratones por medio del ensayo de micronúcleos y Mojica (2001) obtuvo los mismos resultados por medio de la prueba de intercambio de cromátidas hermanas al inhibir a la DAU.

Por otra parte algunos experimentos in vitro mostraron evidencia de los efectos antitumorales del jugo de toronja e indicaron que sus flavonoides, pueden ser los responsables de la inhibición de la proliferación de las células cancerígenas mamarias (Tirillini, 2000). Por otra parte, la hesperetina y la naringina inhibieron la tumorigénesis mamaria inducida en ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley, mientras que el aurapteno otro flavonoide de la toronja, funcionó como profiláctico químico de la tumorigénesis en piel (Tirillini, 2000).

Los compuestos polifenólicos del jugo de toronja tienen propiedades antimutagénicas, anticarcinogénicas y antiinflamatorias, beneficiosas en la prevención de enfermedades y en la protección del genoma, particularmente para las células epiteliales intestinales, uno de los tejidos más proliferativos del cuerpo (Jagetia y Reddy, 2002).

4.4.3.4 Actividades antioxidantes de la toronja

Se ha sugerido que los compuestos polifenólicos, tienen actividad antioxidante, con respecto a esto, redujeron la lipoperoxidación de las lipoproteínas de baja densidad por diversos mecanismos, los cuales incluyen atrapar RL, provocar quelación de metales de transición que actúan como prooxidantes como el cobre y el fierro, o bien renovando a la vitamina E y carotenoides, quienes son antioxidantes íntimamente asociados con estas lipoproteínas (Gutiérrez, 2002; Heijnen y cols., 2002; kanno y cols., 2003; Jeon y cols., 2001).

Además, la naringina redujo los lípidos en el plasma in vivo e inhibió la hipercolesterolemia en conejos (Jeon y cols., 2001). La reducción de lípidos por la naringina y la hesperetina también se demostró en roedores (Choi y cols., 2001).

Más recientemente se reportó su capacidad para reducir aterosclerosis (Choe y cols., 2001) y además, al igual que muchos polifenoles se demostró su acción preventiva en la aparición de problemas cardiovasculares (Gutiérrez, 2002; Sun y cols., 2002).

También uno de los componentes de la cáscara de la toronja; la pectina, disminuye los niveles de colesterol y la aterogénesis con hipercolesterolemia (Tirillini, 2000).

Por otra parte, el jugo de toronja contiene las vitaminas A, C y E, las cuales redujeron la lipoperoxidación en microsomas hepáticos de ratón, provocada por la adriamicina un compuesto del grupo de las rodamicinas, estas vitaminas ejercen su acción antioxidante reaccionando directamente con los agentes oxidantes y/o a través de su capacidad para regenerarse entre sí (Mimnaugh y cols., 1985; García y cols., 2001). Con respecto a algunos de los minerales contenidos en el jugo, por sí mismos son efectivos en la prevención de la aterosclerosis y sus complicaciones (Gorinstein y cols., 2001; Jeon y cols., 2001). Una de sus acciones es competir con metales de transición por sitios celulares (Fraga y Oteiza, 2002), también intervienen en la antioxidación, al formar parte de las enzimas antioxidante endógenas (Jeon, y col., 2001). Estos datos indican que algunos compuestos del jugo de toronja en forma aislada muestran actividades antioxidantes similares, sin embargo, hay pocos estudios in vitro y ninguno in vivo, que hayan evaluado el jugo de toronja completo, un ejemplo de estudios in vitro es el de Gorinstein (2001) quien estudió el potencial antioxidante de tres frutos, entre estos la toronja, cuyo jugo mostró dicha actividad.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron ratones machos de la cepa NIH con un peso promedio de 25 gramos, los cuales procedieron del Instituto Nacional de Higiene, SSA.

Los animales se observaron durante 7 días, en las instalaciones del laboratorio de Genética del departamento de Morfología en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, durante 7 días, antes de iniciar el experimento. Durante su estancia en el laboratorio, se mantuvieron en cajas metálicas con una cama de aserrín, confinadas en un cuarto con temperatura controlada entre 22 y 24 ° C, y con libre acceso al alimento (nutricubos purina) y agua.

El jugo de toronja se obtuvo directamente de la fruta Citrus paradisi var ruby red y se administró recién extraído a los animales.

5.2 MATERIALES Y REACTIVOS

- Jeringas de 1 mL
- Cánula para administración oral
- Balanza granataria (Ohaus) y balanza analítica (Sartorius modelo BP110 S)
- Equipo de disección
- Tubos eppendorff
- Matraces aforados para 10 ml
- Espátula
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma) al 0.2%
- Ácido tricloroacético (Productos químicos Monterrey) al 40% y al 70%.

- Sulfato de hierro (Productos químicos Monterrey)
- Solución salina fisiológica
- Amortiguador de fosfatos a pH =7.4
- Ácido etilendiaminotetracético 1mM (EDTA) (Harleco)
- Agitador vortex (2 Genie, modelo G-560)
- Micropipetas (Boeco) para 5-50 mL y 50-1000mL
- Puntas para micropipetas
- Hielo
- Gradillas metálicas inoxidables
- Recipiente para ebullición.
- Centrífuga (Sol-bat, aparatos científicos)
- Celdas de cuarzo
- Tubos de ensayo 10 X 75 mm
- Vasos de precipitado de 20 ml
- Congelador -70° C
- Ultracentrífuga
- Espectrofotómetro (Specxtronic^o 20 genesys, modelo 400L/4)
- Incubadora para baño María (Riossa)
- Solución de KCl 150 mM
- Agua destilada
- Agua desionizada
- 1,4-ditiotreitol al 0.1 mM (Sigma)
- Glicerol al 20% (Sigma)
- 1,1,2,3-tetraetoxipropano (TEP) (Sigma)
- Daunorrubicina (Rubilem^o, 20 mg)
- Soluciones 0.1, 0.2, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, y 4.8 mM de TEP
- Solución stock de albúmina
- Reactivo de Bradford
- TRIS (Sigma)
- Ácido ascórbico (Sigma)

5.3 PROCEDIMIENTO

5.3.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL JUGO DE TORONJA IN VIVO.

A continuación se describen los grupos experimentales para este ensayo. Cada grupo estuvo constituido por 3 organismos con las características mencionadas al inicio de este capítulo. Al grupo testigo negativo se le administró por la vía oral 0.3 mL de agua destilada, el testigo positivo con 2.5 mg/kg de DAU, se administró por vía intraperitoneal. Tres grupos más, se trataron con jugo de toronja recién obtenido, en las dosis de 4.1, 20.8 y 41.6 mL/g respectivamente, esto con la finalidad de observar el efecto del jugo de toronja per se sobre la lipoperoxidación. Otros tres grupos recibieron jugo de toronja en las mismas dosis (4.1, 20.8 y 41.6 mL/g) y una hora más tarde se administraron con DAU (2.5 mg/kg). En estos 3 grupos es donde es probable observar el efecto antioxidante del jugo de toronja. La conformación de los grupos de trabajo se puede observar en la figura 10.

Después de 6 horas de la administración de los compuestos, los animales fueron sacrificados y se les extrajo el hígado para obtener sus microsomas. Una vez obtenidas las muestras de microsomas, a cada una se le cuantificaron las proteínas totales y por último la cantidad de malondialdehído (MDA). Cada uno de los pasos se describe a continuación.

LOTE No.	AGUA (μL)	JUGO DE TORONJA (μL/g)	DAUNORRUBICINA (mg/kg)
1	300	-----	-----
2	-----	-----	2.5
3	-----	4.1	-----
4	-----	20.8	-----
5	-----	41.6	-----
6	-----	4.1	2.5
7	-----	20.8	2.5
8	-----	41.6	2.5

Figura 10. Distribución de los grupos experimentales

5.3.2 OBTENCIÓN DE MICROSOMAS

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajo el hígado; cada órgano se pesó y se colocó en una solución de cloruro de potasio (KCl) 150 mM a 4°C, en una proporción de 1g de hígado/3mL de KCl, posteriormente, cada uno de los hígados se cortó en pequeñas piezas y se homogeneizó durante 5 minutos. Las muestras se depositaron en tubos de plástico y se centrifugaron a 10, 000 g durante 10 minutos a 4° C. La pastilla se desechó y el sobrenadante se centrifugó a 105, 000 g durante una hora a 4 °C. La pastilla resultante se

suspendió en amortiguador de fosfatos (pH=7.4) a 4 °C (al que se adicionó la cantidad de mililitros de KCl que inicialmente tenían las muestras, es decir, se conservó constante el volumen de KCl en proporción 3:1) y los tubos se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones (Bianchini y Wild, 1994).

De esta manera se obtuvo la fracción microsomal, la cual se resuspendió en amortiguador de fosfatos y se le adicionó ácido etilendiaminotetracético 1 mM, 0.1 mM de 1,4-ditiotreitol y glicerol al 20%. Cada una de las suspensiones obtenidas de acuerdo a lo descrito, se separaron en alícuotas de 100 μ L y se conservaron a – 70 °C (Bianchini y Wild, 1994).

Posteriormente, a cada una de las alícuotas se les cuantificaron las proteínas totales, dato importante en la cuantificación del MDA.

5.3.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La cuantificación de proteínas totales se llevó a cabo de acuerdo al método de Bradford, el cual se basa en la unión del colorante Azul de Coomassie y las proteínas formando un complejo que puede ser detectado por espectrofotometría (Kirazov y cols., 1993; Sapan y cols., 1999).

Cada determinación se trabajó por triplicado de la siguiente manera: las muestras se diluyeron hasta 1:20 en agua destilada en tubos de ensayo, posteriormente 20 μ L de cada dilución se mezcló con 1 mL de solución diluida de Bradford (1:5). Finalmente, se leyeron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 595 nm (Sapan y cols., 1994).

Se construyó una curva de calibración por medio de la cual se calcularon las concentraciones de cada muestra. Cada punto se trabajó por triplicado de la siguiente forma: se tomó el volumen equivalente a: 4 mg, 8 mg, 12 mg y 16mg de albúmina a partir de una solución de albúmina con una concentración de 200 µg/mL y se transfirieron a tubos de ensayo, luego cada uno se mezcló con 1 mL de solución diluida de Bradford (1:5), se leyeron en el espectrofotómetro y con las absorbancias promedio leídas y utilizando el método de mínimos cuadrados, se calcularon los valores de la pendiente y la ordenada al origen de la ecuación de una línea recta ($y = mx + b$), así, se conoció la concentración de albúmina equivalente a las proteínas totales presentes en cada tubo. Finalmente, los valores obtenidos fueron comparados estadísticamente por medio de la prueba de Student- Newman- Keuls.

5.3.4 CUANTIFICACIÓN DE MALONDI ALDEHÍDO

Por último a cada muestra se le hizo la cuantificación del MDA se llevó a cabo mediante el ensayo de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) desarrollada por Kohn y Liversedge por primera vez y posteriormente modificada por Ohkawa. Este ensayo se basa en la formación de un complejo colorido entre el malonaldehído procedente de la lipoperoxidación microsomal y el reactivo ácido tiobarbitúrico, el cual puede ser leído por espectrofotometría (Ohkawa y cols., 1979).

El procedimiento se realizó por duplicado y consistió en lo siguiente: los microsomas se colocaron en tubos de ensayo a una concentración de 1 mg de proteína por cada mL de volumen final y se incubaron a 37 ° C durante 1 hora en baño María; transcurrido este tiempo, a cada tubo se le agregaron 0.25 mL de

ácido tricloroacético al 40 % más 0.25 mL de ácido tiobarbitúrico (recién preparado) al 0.2 %. Las muestras se agitaron y después se hirvieron durante 15 minutos, posteriormente se enfriaron en hielo durante 5 minutos y se les agregaron 0.5 mL de ácido tricloroacético al 70%, luego se dejaron reposar por 20 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron por 20 minutos a 1500 rpm, se retiró el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 3500 rpm. Finalmente, el sobrenadante se leyó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 532 nm (Du y Bramlage, 1992; Moore y Roberts, 1998).

Para calcular la concentración de MDA en las muestras, se realizó una curva de calibración con 1,1,2,3,-tetraetoxipropano en cada determinación y los datos fueron tratados de la misma forma que para la "cuantificación de proteínas totales".

5.3.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL JUGO DE TORONJA IN VITRO.

Para llevar a cabo esta evaluación se administraron 8 ratones con 0.3 mL de agua destilada, a partir de los cuales se obtuvieron los microsomas hepáticos de la misma forma que se describió en la sección 5.3.2; "obtención de microsomas". Las fracciones microsomales obtenidas se reunieron en una sola muestra para cuantificar las proteínas totales por el método de Bradford descrito en la parte; "cuantificación de proteínas" y se separaron en alícuotas de 50 µL cada una y se conservaron a -70° C.

En este experimento se utilizó como agente inductor de RL al conocido sistema hierro (II)-ácido ascórbico (Fe/Asc). El testigo positivo consistió en mezclar

amortiguador de TRIS ((0.2 M)/ KCl (150 mM)) a pH 7.0, microsomas hepáticos (1 mg proteína/mL), FeSO₄ al 0.4 μM y ácido ascórbico recién preparado al 0.3 mM en un volumen final de 1.25 mL (Bishayee y Balasubramanian, 1971).

Como testigo negativo se incubaron microsomas, 10 μL de agua desionizada y amortiguador de TRIS a pH 7.0.

La evaluación de la antioxidación del jugo de toronja consistió en agregar el sistema inductor y jugo de toronja a diferentes concentraciones, detalladas en la figura 11.

Después de preparar todos los sistemas anteriormente descritos, se incubaron a 37°C durante una hora y finalmente, se les cuantificó su nivel de MDA por medio del ensayo TBARS, de la misma forma descrita para la determinación de la lipoperoxidación en microsomas de ratón in vivo (sección 5.3.4: "cuantificación de malondialdehído"). Cada sistema se llevó a cabo una sola vez.

Tubo	Agua desionizada (μL)	TRIS/KCl (μL)	Jugo de toronja (ppm)	Microsomas (μL)	Fierro /ácido ascórbico (μL)
Testigo negativo	10	221	-----	19	-----
Testigo positivo	-----	106	-----	19	125
Jugo de Toronja	-----	221	266	19	-----
Jugo de Toronja	-----	181	1332	19	-----
Jugo de toronja + Fe/Asc	-----	96	80	19	125
Jugo de toronja + Fe/Asc	-----	86	160	19	125
Jugo de toronja + Fe/Asc	-----	76	240	19	125
* Jugo de toronja + Fe/Asc		181	266	19	40
* Jugo de toronja + Fe/Asc	-----	91	2664	19	40
Los reactivos fueron agregados de izquierda a derecha, conforme lo indica el cuadro.					

Figura 11. Distribución de los sistemas para el estudio in vitro.

*En estos sistemas se incubó el TRIS/KCl, más jugo de toronja y los microsomas, durante media hora, antes de agregar el FeSO₄ - ácido ascórbico.

6. RESULTADOS

La oxidación de los lípidos microsomales hepáticos da origen a diversos subproductos, los cuales, a través de su cuantificación en microsomas aislados, permiten conocer el grado en el que este proceso se está llevando a cabo, en los organismos que han sido o no tratados con los compuestos en estudio. En nuestro trabajo de investigación, el subproducto de la lipoperoxidación de interés fue el malondialdehído, el cual nos permitió realizar una comparación entre los grupos experimentales.

6.1 OBTENCIÓN DE MICROSOMAS

Como primer resultado, obtuvimos las muestras microsomales de acuerdo a lo descrito en el procedimiento. Para el estudio *in vivo* a partir de cada uno de los organismos, se obtuvieron aproximadamente 1000 μL de microsomas hepáticos suspendidos en una solución amortiguadora de fosfatos dentro de tubos eppendorff. Posteriormente, a cada alícuota se le cuantificaron las proteínas, cuyos resultados se explican adelante. Para el ensayo *in vitro* se obtuvieron aproximadamente 60 μL de muestra por cada organismo los cuales se juntaron para obtener una sola muestra microsomal homogénea en solución amortiguadora y ésta se dividió en alícuotas de aproximadamente 50 μL en tubos eppendorff.

6.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La figura 12 muestra los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo*. Se elaboró con los promedios de las concentraciones de proteínas totales por cada lote. Las determinaciones varían entre 7.72 mg / mL y 13.46 mg / mL en los grupos experimentales.

Con relación al estudio *in vitro*, la concentración proteica promedio de la mezcla homogénea de microsomas para el ensayo fue de 16.71 mg / mL.

Cabe mencionar que para el ensayo *in vivo*, se determinó la concentración final de proteínas a cada una de las muestras provenientes de cada organismo, a diferencia del ensayo *in vitro*, donde al juntarse todas las muestras se obtuvo una sola mezcla y una misma concentración proteica. Ambos por medio del método de Bradford.

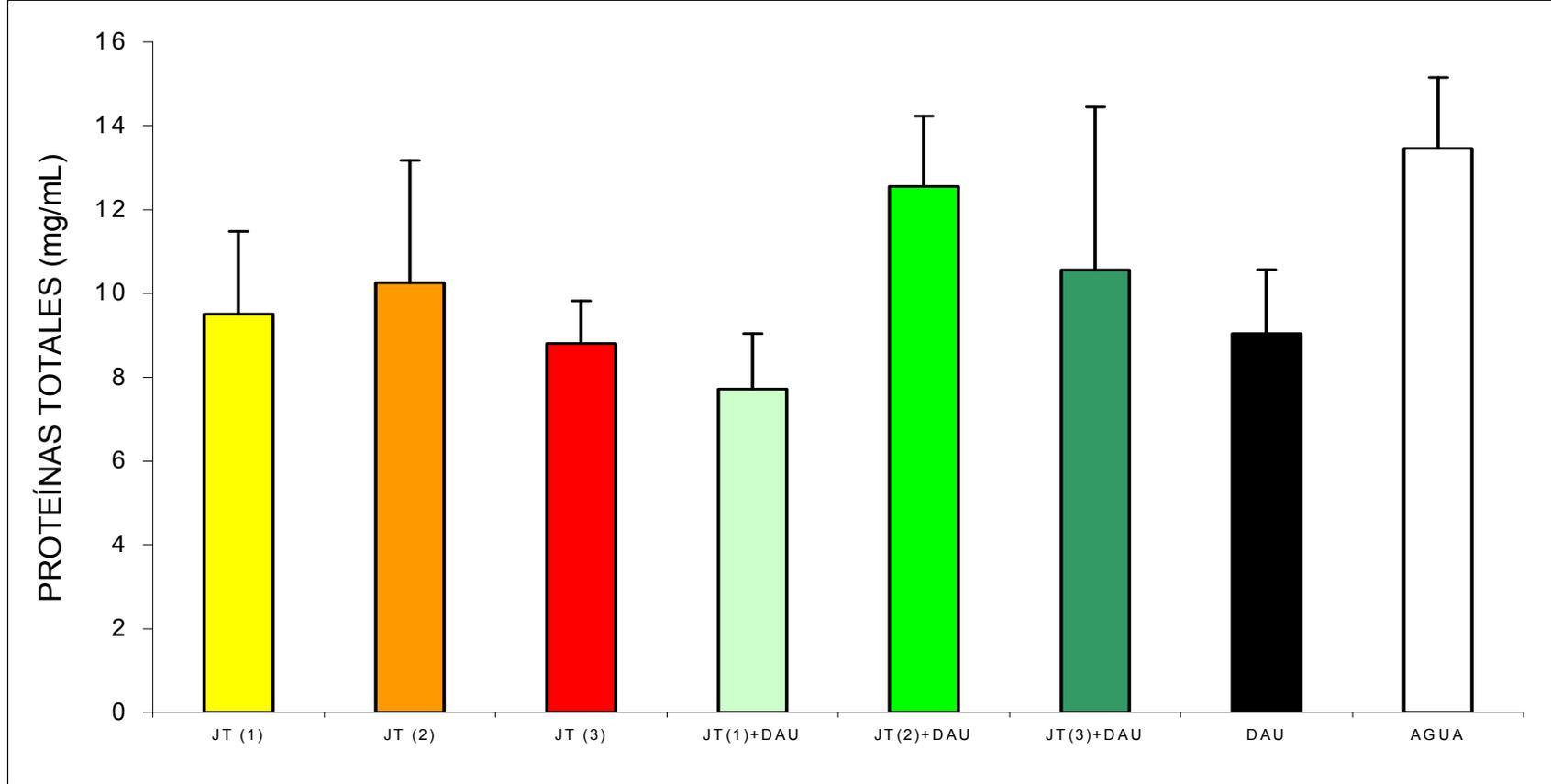


Figura 12. Promedio de las concentraciones de proteínas totales en cada uno de los grupos experimentales tratados con agua, daunorrubicina (DAU), jugo de toronja (JT) y sus combinaciones.

JT(1) = 4.1 $\mu\text{L/g}$ de JT.

JT(2)= 20.8 $\mu\text{L/g}$ de JT.

JT(3)= 41.5 $\mu\text{L/g}$ de JT. DAU=2.5 mg/kg.

6.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL JUGO DE TORONJA *IN VIVO*.

Este estudio se realizó con los microsomas hepáticos de los ratones que se administraron con agua, jugo de toronja a las dosis 4.1 μL , 20.8 μL y 41.6 $\mu\text{L}/\text{kg}$ y/o DAU (2.5 mg/kg). Los valores promedio de la concentración de malondialdehído obtenidas para esta evaluación, se registraron en la figura 13.

La prueba estadística que se utilizó para analizar las diferencias fue la de Student-Newman – Keuls, con un $\alpha = 0.05$.

Inicialmente, el testigo negativo tuvo un valor de 1.8 μM , a diferencia del testigo positivo, en el cual se observa un incremento de 2.36 veces el valor del grupo tratado con agua, lo cual demuestra que la DAU en la dosis administrada funcionó como inductor de lipoperoxidación de los organismos tratados.

Con relación al jugo de toronja, en la misma figura se observa que administrado a las dosis 4.1, 20.8 y 41.6 $\mu\text{L} / \text{g}$ (JT1, JT2 y JT3), alcanzó concentraciones de 0.42 μM , 0.46 μM , 0.72 μM de malondialdehído respectivamente. Estas concentraciones son aún menores a los del lote testigo negativo tratado con agua, pero entre ambos lotes no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, resultados que muestran que el jugo de toronja *per se* no produjo lipoperoxidación.

En la figura 14 se observan los valores promedio de las concentraciones de malondialdehído obtenidos en los grupos experimentales administrados con las 3 combinaciones del jugo de toronja más la DAU. El testigo negativo (agua) continúa

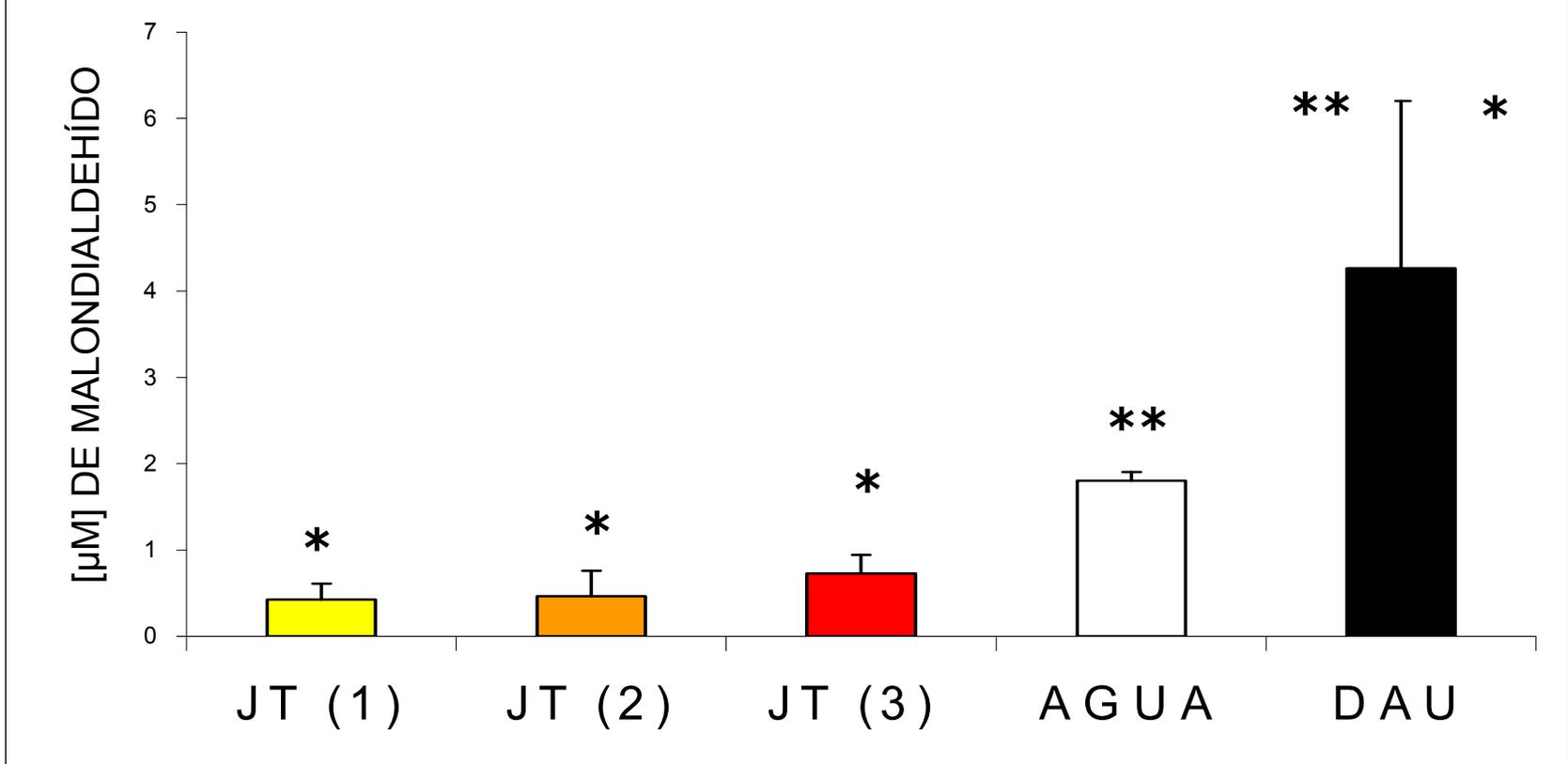


Figura 13. Lipoperoxidación producida por el jugo de toronja en microsomas hepáticos de ratones tratados con jugo de toronja (JT), agua y daunorrubicina (DAU).

JT(1)= 4.1µL/g de JT. JT(2)= 20.8 µL/g de JT. JT(3)= 41.5 µL/g de JT.

*diferencia estadísticamente significativa con respecto al control positivo por medio de la prueba de Student-Newman-Keuls ($\alpha=0.05$). ** diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo por medio de la prueba de Student-Newman-Keuls ($\alpha=0.05$).

con un valor de 1.8 μM , mientras que el testigo positivo (DAU) tuvo un valor de 4.26 μM .

La concentración de malondialdehído observada en la primer combinación: JT1 + DAU (4.1 $\mu\text{L/g}$ mas 2.5 mg/kg de DAU) fue de 2.32 μM y estadísticamente significativa con respecto al control positivo (DAU), no mostró diferencia significativa con respecto al control negativo (Figura 14).

En la segunda combinación: JT2 + DAU (20.8 $\mu\text{L/g}$ mas 2.5 mg/kg de DAU) se produjo una concentración similar a la anterior (1.73 μM). Finalmente, en el último lote: JT3 + DAU (41.6 $\mu\text{L/g}$ mas 2.5 mg/kg de DAU) nuevamente se presentó diferencia significativa en el nivel de malondialdehído (1.89 μM), en comparación con el que mostró la DAU (Figura 14). En general, los resultados descritos establecen un efecto protector del jugo de toronja contra la oxidación producida por la DAU.

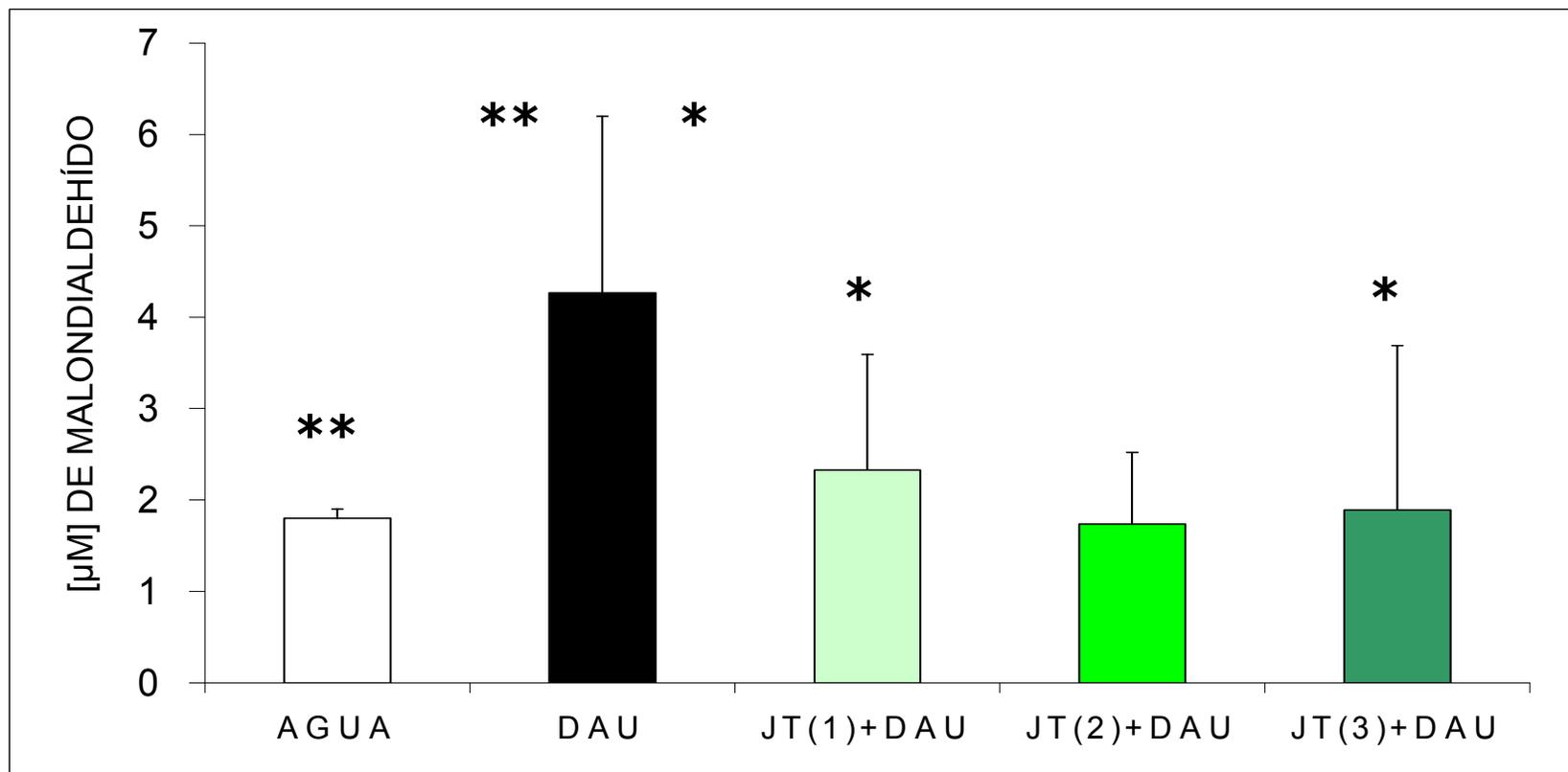


Figura 14. Efecto del agua, la daunorrubicina (DAU) y el jugo de toronja (JT) sobre la concentración del malondialdehído derivado de la lipoperoxidación *in vivo*.

JT(1)+DAU= 4.1 μ L/g de JT+ 2.5mg de DAU. JT(2)+DAU= 20.8 μ L/g de JT+ 2.5mg de DAU. JT(3)+DAU= 41.6 μ L/g de JT+ 2.5mg de DAU. *diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo positivo por medio de la prueba de Student-Newman-Keuls ($\alpha=0.05$). ** diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo por medio de la prueba de Student-Newman-Keuls ($\alpha=0.05$).

6.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL JUGO DE TORONJA *IN VITRO*.

Este estudio se realizó con microsomas hepáticos de ratón, en los cuales se evaluaron diferentes concentraciones de jugo de toronja (Figura 11), para determinar su efecto antioxidante frente a la lipoperoxidación producida *in vitro* por el sistema Fe/Asc. Los valores de la concentración de malondialdehído que se obtuvieron en el estudio, se registraron en la Figura 15.

Para la estandarización del sistema inductor de RL se utilizaron varias concentraciones de H₂O₂ como oxidante, pero no se obtuvieron los resultados deseados, así que se probó con FeSO₄ y ácido ascórbico a diferentes concentraciones y varios pH's hasta que se encontró el sistema correcto (TRIS ((0.2M)/ KCl (150mM)) a pH 7.0 + FeSO₄ al 0.4 μM + ácido ascórbico recién preparado al 0.3 mM), por lo que el homogeneizado microsomal fue insuficiente, así que, el ensayo sólo se pudo llevar a cabo una sola vez.

En la citada figura, observamos que el valor del testigo positivo fue de 10.25 μM, mientras que el testigo negativo tuvo 0.36 μM, como se puede observar, la diferencia es de 28.47 veces entre ambos, lo cual confirma que el sistema FeSO₄ (0.4 μM) - ácido ascórbico (0.3 mM), funcionó como inductor de la lipoperoxidación en los microsomas.

En la misma figura se observa que la menor concentración de jugo de toronja (barra A) produjo una cantidad de malondialdehído menor a la que se observó en el testigo negativo y que el testigo positivo, lo que indica que a esta concentración el jugo de toronja no produjo lipoperoxidación. Una situación similar se observó al evaluar la concentración más alta de jugo de toronja (barra B), en este caso, el valor fue semejante al del testigo negativo, y es 25.4 veces menor que el

correspondiente al positivo. En resumen, el jugo de toronja no es un agente lipoperoxidante *in vitro*.

Por lo que respecta al efecto inhibitorio del jugo de toronja sobre la lipoperoxidación producida por el sistema Fe/Asc, los resultados muestran que las dos concentraciones más bajas del jugo de toronja no tuvieron efecto sobre el valor obtenido en el testigo positivo, sin embargo, la concentración más alta de jugo de toronja (266 ppm) redujo la lipoperoxidación inducida por Fe/Asc cerca de un 50% (barra C), y con la siguiente concentración (2664 ppm), la reducción fue similar (barra D), es decir, las 2 concentraciones más altas del jugo de toronja mostraron un efecto antilipoperoxidante.

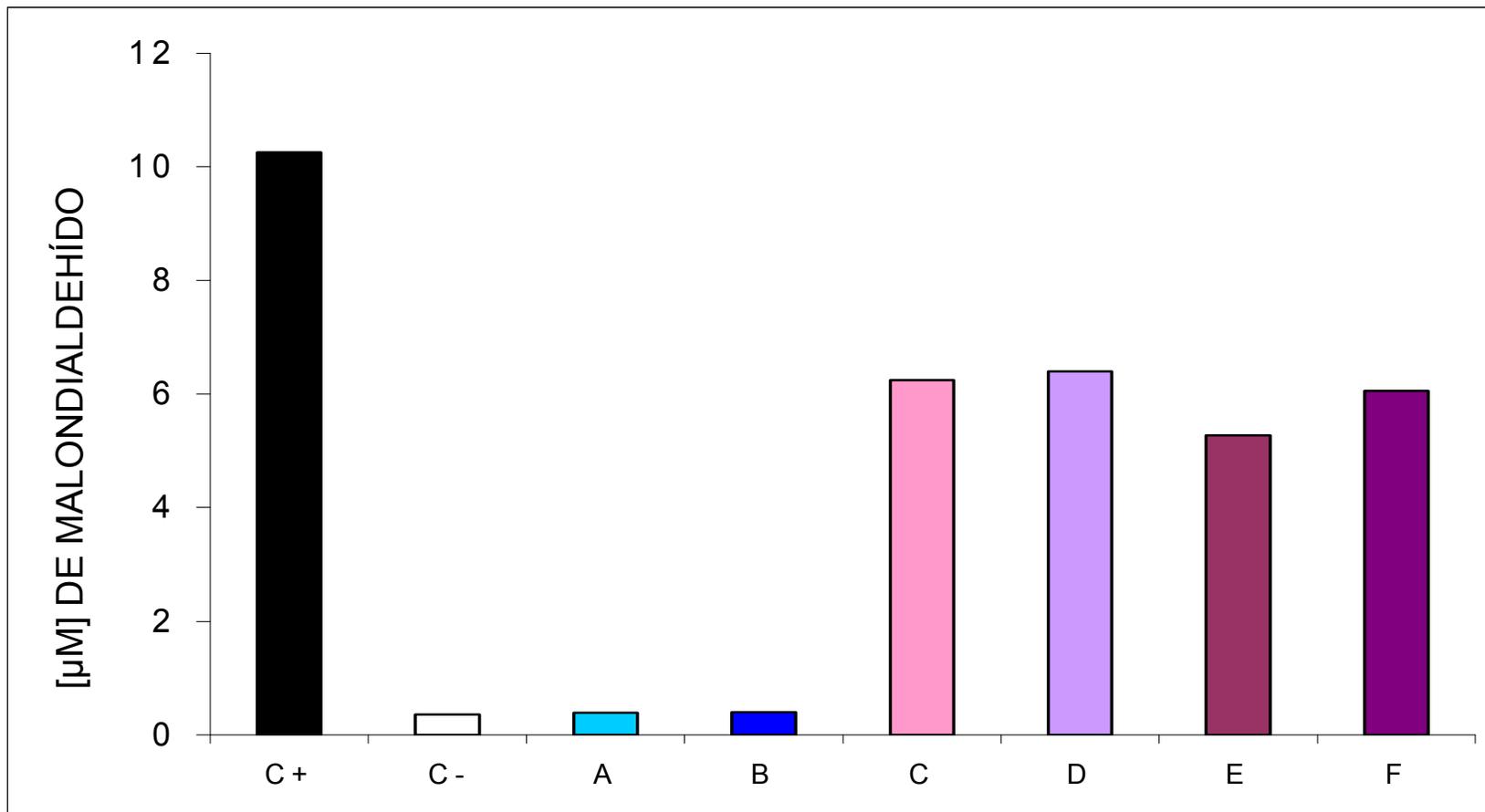


Figura 15. Efecto del agua, la daunorrubicina (DAU) y el jugo de toronja (JT) sobre la concentración de malondialdehído derivado de la lipoperoxidación en microsomas hepáticos *in vitro*.

C+=2.5 mg/kg de DAU. C-=agua. A=266 ppm JT. B=1332 ppm JT. C=266 ppm JT+ fierro(II)/ácido ascórbico (Fe/Asc). D=2664 ppm JT+Fe/Asc. E=266 ppm JT(30 minutos incubación) F=2664 ppm JT(30 minutos incubación)+Fe/Asc.

7. DISCUSIÓN

La lipoperoxidación es el proceso en el que los lípidos reaccionan con los radicales libres generando diversos subproductos que pueden ser cuantificables usando diferentes herramientas, como la espectroscopía, quimioluminiscencia, cromatografías de gases y líquidos e incluso técnicas inmunológicas. En este trabajo se utilizó la cuantificación del malondialdehído por espectrofotometría, como marcador de la lipoperoxidación, por medio del ensayo TBARS, debido a que es un ensayo económico, sencillo de ejecutar y con una alta sensibilidad (Bianchini y Wild, 1994)

Con respecto al efecto antioxidante de la toronja, en 1986 se realizaron estudios en los que a partir del jugo, se obtuvieron extractos alcohólicos de los cuales se aislaron parte de sus flavonoides, demostrando poseer actividad antioxidante (Tirillini, 2000).

Posteriormente se compararon las características antioxidantes de varios cítricos mediante la determinación del potencial antioxidante (TRAP), uno de estos cítricos fue la toronja y los resultados indicaron que el fruto sin cáscara posee dicho potencial (Gorinstein y cols., 2001).

En otro estudio se obtuvo un extracto en agua-metanol a partir de la toronja y se le midió su actividad antioxidante por medio de tres ensayos, uno de ellos fue el efecto antioxidante equivalente al Trolox[®], un antioxidante estándar, el segundo fue la habilidad reductora de un complejo férrico y el tercero basado en la oxidación de una proteína fosforescente; en dichos ensayos el extracto también mostró su actividad antioxidante, aunque fue menor al observado en otros frutos (García y cols., 2001).

Poco tiempo después se publicó la cuantificación de la actividad antioxidante total de extractos fitoquímicos de varios frutos, entre ellos la toronja, esta medición se llevó a cabo por medio de un ensayo en el que se generaron radicales peroxil por termólisis de un compuesto estándar, los cuales fueron atrapados por el extracto de la toronja y los resultados revelaron que el extracto de la toronja posee dicha actividad (Sun y cols., 2002).

Por otro lado, algunos de los compuestos que integran la toronja en su forma individual han demostrado esta propiedad; tal es el caso de compuestos como la naringina, las vitaminas A, C, E, β - carotenos y los minerales (Álvarez, 2002; Gorinstein, cols., 2001; Jeon, 2002; Tian y cols., 2002; Tirillini, 2000).

Cabe mencionar que descartamos que el jugo de toronja fuera capaz de inducir la lipoperoxidación por sí mismo a través del ensayo en el cual se midieron los niveles del MDA de microsomas hepáticos de ratones administrados únicamente con jugo de toronja, con lo cual concluimos que el jugo de toronja no induce lipoperoxidación a las dosis de 4.1 a 41.5 μ L/g, por vía oral (Álvarez, 2004).

El jugo de toronja demostró poseer un efecto inhibitorio de la lipoperoxidación producida por la DAU con las tres dosis utilizadas, aunque sólo dos de ellas fueron estadísticamente significativas. En nuestro sistema, la DAU constituye una fuente extrínseca de RL, debido a que posee una estructura quinona que puede ser reducida química o enzimáticamente formando un radical libre semiquinona, el cual al reaccionar con el oxígeno resulta en la formación de radicales $\cdot\text{O}_2$, H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$ (Fraga y Oteiza, 2002; Marián y Matkovics, 1982) metabolitos que le confieren una alta toxicidad. Cariño (2002) demostró, por medio del ensayo cometa que la genotoxicidad aguda de la DAU se produce principalmente en el hígado alcanzando

un máximo a las 12 horas posteriores a su administración intraperitoneal. Por otro lado, los estudios sobre la interacción entre el jugo y diversos fármacos se presenta minutos después de su administración y continúa hasta 10 horas después (Giorgi y cols., 2003).

Son diversas las investigaciones acerca de la capacidad antioxidante de compuestos que también se encuentran en la toronja, por ejemplo, se demostró que la vitamina E (α -tocoferol), inhibió la lipoperoxidación en diferentes condiciones. Por ejemplo, protegió contra la lipoperoxidación de la membrana de núcleos aislados (Tirmenstein y Reed, 1989) y además en un sistema *in vitro* a una concentración de 10 μ M inhibió la inducida con adriamicina (Mimnaugh y cols., 1985), un análogo de la DAU, íntimamente relacionado con ésta, ya que sólo se diferencia porque tiene un grupo OH en vez de un H en el C2 del grupo oxoradical en la aglicona, sin embargo ambos comparten la misma estructura quinona y rutas metabólicas causantes de la producción de los RL.

En un cultivo de hepatocitos de rata, al cual se le agregó α -ácido linoléico y α -tocoferol, se observó reducción de la lipoperoxidación inducida con 50 μ M del mismo antibiótico (Furuno y cols., 1998). Además, la misma combinación en estudios *in vivo* inhibió la lipoperoxidación causada por el mismo compuesto y protegió contra sus efectos tóxicos letales en ratas y ratones (Myers y cols., 1997). A este respecto, la suplementación oral de vitamina E (10, 45 o 200 mg/kg de peso corporal por día) disminuyó proporcionalmente el incremento de la producción de malondialdehído e incrementó la actividad de la superóxido dismutasa en los eritrocitos de ratones administrados con adriamicina (5 mg/kg).

Otro estudio reveló que la administración de un derivado de la vitamina E, equivalente a 10-50 mg de vitamina E/kg, disminuyó la cantidad de

malondialdehído producido por adriamicina (Quiles y cols., 2002). Más recientemente, también se demostró que 35, 75 y 125 ppm de vitamina E, disminuyeron la lipoperoxidación *in vitro* del ácido linoléico entre 24 y 240 horas, observándose la mayor inhibición a las 24 horas (71.54% con 125 ppm)(Cariño, 2002).

La vitamina E es un importante agente secuestrador de radicales peróxidos, oxígeno singlete y otras especies reactivas de oxígeno en las fases lipídicas biológicas (García y cols., 2001), por lo que es probable que participe en el resultado del presente estudio, sin embargo, debido a que el jugo contiene otros componentes, también es factible la interacción con uno o más compuestos para aumentar o disminuir la actividad.

Una de dichas interacciones es la reducción de la vitamina E por agentes reductores solubles en agua, tales como la vitamina C, la cual por sí sola ha demostrado una importante acción antioxidante en sistemas *in vitro* (García y cols, 2001). Por ejemplo, el compuesto previno la lipoperoxidación en cultivos celulares de hígado de rata (Huang y May, 2003), también en células neuronales (Li y May, 2003), y en humanos. El consumo de 2g/día, disminuyó los síntomas, la intensidad y la duración del catarro, al neutralizar los oxidantes liberados por los neutrófilos, ya que esta vitamina es el antioxidante más importante en el plasma humano (Pino y cols., 2000). Por otro lado, la administración intraperitoneal de una mezcla de 2g/kg de ácido ascórbico mas 5 mg/kg de adriamicina a ratones, inoculados con células leucémicas L1210, fue positiva ya que redujo la producción de malondialdehído en hígado y aumentó la supervivencia de los ratones, sin interferir con su potencial antineoplásico (Fujita y cols., 1982).

La cantidad ingerida de ácido ascórbico (35 mg/100g) en el jugo de toronja pudo contribuir en la regeneración de otros antioxidantes. A este respecto, Lykkesfeldt (2002), administró dos grupos de cerdos de guinea con dos regímenes dietéticos, uno con 36 mg de vitamina C/kg como dieta deficiente en dicha vitamina y otro con 1036 mg/kg como dieta normal. El estudio se efectuó durante 30-34 días y posteriormente se midieron los niveles de vitamina E, de glutatión, la actividad de la enzima superóxido dismutasa y como índice de lipoperoxidación se cuantificó el malondialdehído en hígado; se observó que la deficiencia de vitamina C disminuyó la concentración de vitamina E y de glutatión y que los niveles de malondialdehído incrementaron significativamente en el hígado, con respecto al grupo con dieta normal de vitamina C.

A bajas concentraciones el ácido ascórbico puede contribuir con agentes oxidantes. A este respecto, en un estudio *in vitro* evaluamos la capacidad antioxidante del jugo de toronja por medio del ensayo TBARS en el cual se logró la inducción en un sistema que involucra TRIS (0.2 M)/KCl (150 mM) a pH 7.0, microsomas hepáticos y finalmente los agentes oxidantes, es decir, el FeSO₄ y el ácido ascórbico. Bajo estas condiciones el jugo de toronja disminuyó la concentración de malondialdehído con respecto al control positivo en los microsomas que estuvieron en contacto con tales agentes oxidantes.

Aunque el ensayo se realizó una sola vez, los resultados en cuanto al efecto antioxidante coinciden con el ensayo *in vitro* llevado a cabo por Álvarez en el 2004, por medio de la concentración del malondialdehído, el jugo de toronja disminuyó los efectos de la DAU.

Por otra parte, con respecto a la vitamina A, se demostró en estudios recientes que previno los disturbios provocados por la lipoperoxidación en ratas diabéticas,

lo cual fue probado a través del ensayo TBARS (Zobali y cols., 2002). Con respecto al β -caroteno se ha reportado que reduce la lipoperoxidación producida por la adriamicina en microsomas hepáticos de ratas (Quiles y cols., 2002). El retinol también ha ofrecido buenos resultados en varios tejidos de rata, tales como microsomas hepáticos, corazón, membranas cerebrales y bazo (Quiles y cols., 2002).

El β -caroteno, también llamado provitamina A, tiene una fuerte acción antioxidante que se reconoce por la neutralización del oxígeno singulete por un mecanismo de transferencia de energía radical, formación de un triplete de vitamina A y posteriormente, disipación de esta energía, con regeneración de la vitamina. Aunque la eficiencia de esta vitamina no es alta con respecto a otros compuestos del grupo, es posible que su presencia en el jugo influyera en los resultados del trabajo (García y cols., 2001).

Como ya describimos, las vitaminas A, C y E tienen actividad antioxidante en forma aislada pero también actúan sinérgicamente cuando se combinan, bajo estas condiciones se demostró la inhibición de la lipoperoxidación en tejido pancreático de hámsters sirios, así como de cáncer pancreático (Wenger y cols., 2001). Estos datos apoyan la posibilidad de cooperación entre los componentes del jugo de toronja por incrementar su antioxidación.

Por otro lado, los flavonoides también son reconocidos como antioxidantes. Al respecto se ha demostrado la actividad de una flavonona predominante en la toronja, la naringina. Ueng y cols. (1999) demostraron el efecto quimiopreventivo de este compuesto contra varios pro-oxidantes y, Ratty y Das (1988), mostraron que actúa como un atrapador de $\cdot\text{O}_2$ y contra los hidroperóxidos, pero, además, también presenta un efecto economizador de la vitamina E (Kanno y cols., 2003).

La naringina es un agente que puede presentar varias acciones, como se demostró en células leucémicas en cultivo, donde inhibió la citotoxicidad, la apoptosis y la lipoperoxidación inducida por H_2O_2 , además, se observó que la toxicidad del H_2O_2 depende del nivel de glutatión reducido y que la naringina juega un papel importante al incrementar la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa.

Los autores especulan que puede afectar la expresión de los genes para aumentar la capacidad del sistema antioxidante endógeno (Kanno y cols., 2003) Estos datos son afines a otro estudio en el que se presentó la inhibición dosis dependiente de la xantina oxidasa, enzima que participa en la toxicidad de la DAU produciendo los RL (Russo y cols., 2000).

Por otro lado, la naringina, también ha mostrado un efecto inhibitorio (dosis dependiente) sobre la formación del $\cdot O_2^-$, aunque en porcentajes menores que el logrado por otros flavonoides.

En síntesis la información sobre la naringina sugiere que además de su capacidad antioxidante, contribuye a la regeneración de la vitamina E y potencializa los antioxidantes endógenos, por lo que su participación en el efecto del jugo de toronja puede ser relevante (Kanno y cols., 2003; Russo y cols., 2000).

Por último, en el jugo de toronja, se encuentran metales como el cobre, hierro y zinc, y estos forman parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes (Rodríguez y cols., 2001). El zinc es uno de los metales relacionados con este proceso, su eficiencia radica en competir con el hierro por sitios celulares en los que actuaría generando RL y al reemplazar al hierro previene su ciclo reductivo y

disminuye la oxidación de los lípidos. Esta acción se probó *in vitro* por medio del TBARS, con el que se observó una inhibición de un 40%, en liposomas incubados en presencia de hierro (Fraga y Oteiza, 2002).

Como ya se mencionó, el jugo de toronja posee diferentes cantidades de vitaminas, carotenos y polifenoles, compuestos que de acuerdo a Pineda y cols., (1999) son los principales antioxidantes presentes en frutas y vegetales. Por lo tanto, es de esperarse un importante efecto del jugo de toronja.

La información que se ha expresado establece la capacidad antioxidante de compuestos que conforman al jugo de toronja, lo que explica nuestros resultados. En este sentido, es conveniente relacionar esta acción con la capacidad antigenotóxica del jugo de toronja, al respecto nuestro laboratorio ha determinado una alta inhibición de los micronúcleos producidos por la DAU y la ifosfamida en ratón (Álvarez, 2004); la actividad que ha sido confirmada al estudiar la inhibición del intercambio de cromátidas hermanas. Estos hallazgos sugieren una conexión entre la antimutagénesis y la antioxidación, y permiten suponer que el jugo de toronja puede ser un agente quimiopreventivo. Sin embargo, para llegar a esta propuesta es necesario confirmar su efecto sobre otros mutágenos y aplicar modelos biológicos que evalúen su acción a largo plazo.

8. CONCLUSIONES

- El jugo de toronja no indujo lipoperoxidación en microsomas hepáticos in vivo a las dosis 4.1 mL a 41.6 mL / g.
- La daunorrubicina (2.5 mg /kg) indujo lipoperoxidación sobre microsomas hepáticos de ratón in vivo.
- El jugo de toronja (4.1 mL, 20.8 mL y 41.6 mL / g) redujo la lipoperoxidación causada por la DAU (2.5 mg /kg) in vivo.
- Se indujo la lipoperoxidación por medio de TRIS (0.2 M) /KCl (150 mM) a pH 7.0 mas FeSO₄ (0.4 µM) y el ácido ascórbico (0.3 mM) en un sistema microsomal in vitro.
- 266 ppm y 2664 ppm de jugo de toronja inhibieron la lipoperoxidación inducida con el sistema antes descrito sobre microsomas hepáticos in vitro.

9. REFERENCIAS

- Alvarez, I. (2000) Tesis: efecto inhibitorio de la naringina contra la genotoxicidad producida por la ifosfamida y el metil-metano sulfonato in vivo. ENCB, IPN. México. pp. 70–83.
- Alvarez, I. (2002) Tesina predoctoral: efecto inhibitorio del jugo de toronja sobre la genotoxicidad producida por la ifosfamida y la daunorrubicina. ENCB, IPN. México. pp 14-18.
- Alvarez, I. (2004) Tesis: Efecto inhibitorio del jugo de toronja sobre la genotoxicidad producida por la Ifosfamida y la daunorrubicina. ENCB, IPN. México. pp. 59, 60 y 80.
- Barreiro, P. (1999) Claridades agropecuarias. ASERCA, México D. F. 70: 3-28.
- Bergendi, L., Bene, L., Durackova, A., Ferencik, M. (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 65: 1865-1874.
- Bianchini, F., Wild, C. (1994) Effect of route of administration of environmental methylating agents on 7-methylguanine formation in white blood cells and internal organs; implications for molecular epidemiology. *Cancer Lett.* 87: 131-137.
- Bishayee, S., Balasubramanian, A. (1971) Lipid peroxide formation in rat brain. *J. Neurochem.* 18: 909-920.
- Borradaile, N., de Dreu, L., Barrett, P., Behrsin, C., Huff, M. (2003) Hepatocyte ApoB-containing lipoprotein secretion is decreased by the grapefruit flavonoid, naringenin, via inhibition of MTP-mediated microsomal triglyceride accumulation. *Biochemistry* 42: 1283-1291.
- Cariño, R. (2002) Tesis: Evaluación de la actividad antioxidante de la naringina y de su capacidad antigenotóxica contra el daño producido por la daunorrubicina. IPN. México. pp. 17–35.

- Calabresi, P., Chabner, A. (1991) Agentes antineoplásicos, en: Las bases farmacológicas de la terapéutica (ed) Goodman, G., Rall, W. 8ª edición. Panamericana, México. pp. 1171-1222.
- Choe, S., Kim, H., Jeong, T., Bok, S., Park, Y. (2001) Naringin has an antiatherogenic effect with the inhibition of intercellular adhesion molecule-1 in hypercholesterolemic rabbits. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 38: 947-955.
- Choi, M., Do, K., Park, Y., Jeon, S., Jeong, T., Lee, Y., Lee, M., Bok, S. (2001) Effect of naringin supplementation on cholesterol metabolism and antioxidant status in rats fed high cholesterol with different levels of vitamin E. *Ann Nutr Metab* 45: 193-201.
- Dakovic-Svajcer, K., Samojlik, I., Raskovic, A., Popovic, M., Jakovljevic, V. (1999) The activity of liver oxidative enzymes after single and multiple grapefruit juice ingestion. *Exp. Toxicol. Pathol.* 51: 304-308.
- Dorado, A., Revilla, J. (2000) Radicales libres de oxígeno y distress respiratorio agudo. *Rev. Cub. Pediatr.* 72: 214-219.
- Du, Z., Bramlage, W. (1992) Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich tissue extracts. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1566-1570.
- Fennema, O. (1985) Introducción a la ciencia de los alimentos. Reverté, España. Tomos I y II. pp 212 –217, 568 –571.
- Fessenden, R., Fessenden, J. (1983) Reacciones de radicales libres; compuestos organometálicos. En: *Química Orgánica. Iberoamérica.* México. pp. 238 –246.
- Fraga, C., Oteiza, P. (2002) Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology* 180: 23-32.
- Freeman, B., Crapo, J. (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47(5): 412 - 426
- Fujita, K., Shinpo, K., Yamada, K., Sato, T., Niimi, H., Shamamoto, M., Nagatsu, T., Takeuchi, T., Umezawa, H. (1982) Reduction of adriamycin toxicity by ascorbate in mice and guinea pigs. *Cancer Res.* 42: 309-316.

- Furuno, K., Suetsugu, T., Shimomichi, K., Tsuruta, Y., Sugihara, N. (1998) Lipid peroxidation induced by adriamycin in linolenic acid-loaded cultured hepatocytes. *Pharmacol. Toxicol.* 83: 176-182.
- García, L., García, L., Rojo, M., Sánchez, E. (2001) Plantas con propiedades antioxidantes. *Rev. Cub. Biomed.* 20: 231-235.
- Gewirtz, D. (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* 57: 727-741.
- Giorgi, M., Meucci, V., Vaccaro, E., Mengozzi, G., Giusiani, M., Soldani, G. (2003) Effects of liquid and freeze-dried grapefruit juice on the pharmacokinetics of praziquantel and its metabolite 4'-hidroxy praziquantel in beagle dogs. *Pharmacol. Res.* 47: 87-92.
- Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y., Haruenkit, R., Lojek, A., Ciz, M., Caspi, A., Libman, I., Trakhtenberg, S. (2001) Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chem.* 74: 309-315.
- Gutiérrez, A. (2002) Vino, polifenoles y protección a la salud. *Rev. Cub. Alim. Nutr.* 16: 134-141.
- Ho, P., Saville, D., Coville, P., Wanwimolruk, S. (2000) Content of CYP3A4 inhibitors, naringin, naringenin and bergapten in grapefruit and grapefruit juice products. *Pharm. Acta Helv.* 74: 379-385.
- Huang, J., May, J. (2003) Ascorbic acid spares alpha-tocopherol and prevents lipid peroxidation in cultured H4IIE liver cells. *Mol. Cell Biochem.* 247 : 171-176.
- Heijnen, C., Haenen, G., Oostveen, R., Stalpers, E., Bast, A. (2002) Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radic. Res.* 36: 575-581.
- Jagetia, G., Reddy, T. (2002) The grapefruit flavanone naringin protects against the radiation-induced genomic instability in the mice bone marrow: a micronucleus study. *Mutat. Res.* 519: 37-48.

- Jeon, S. Bok, S., Jang, M. Lee, M. Nam, K., Park, Y. Rhee, S., Choi, M. (2001) Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sci.* 69: 2855-66.
- Jeon, S., Bok, S., Jang, M., Kim, Y., Nam, K., Jeong, T., Park, Y., Choi, M. (2002) Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits. *Clin. Chim. Acta* 317: 181-190
- Kanno, S., Shouji, A., Asou, K., Ishikawa, M. (2003) Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *J. Pharmacol. Sci.* 92: 166-170.
- Keizer, H., Pinedo, H., Schuurhuis, G., Joenje, H. (1990) Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical - dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol. Therap.* 47: 219-231.
- Kirazov, L., Venkov, L., Kirazov, E. (1993) Comparison of the Lowry and the Bradford protein assays as applied for protein estimation of membrane-containing fractions. *Anal. Biochem.* 208: 44-48.
- Laurent, G., Jaffrézou, J. (2001) Signaling pathways activated by daunorubicin. *Blood* 98: 913-943.
- Lazo, J., Larner, J. (1994) Individual, antineoplastic drugs en: *Pharmacology molecular and clinical*. Brody, T., Larner J, Minheman. 3^a ed. Mosby, yearbook, Inc. USA. pp. 599-613.
- Li, X., Huang J., May, J. (2003) Ascorbic acid spares alpha-tocopherol and decreases lipid peroxidation in neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 656-661.
- Lykkesfeldt, J. (2002) Increased oxidative damage in vitamin C deficiency is accompanied by induction of ascorbic acid recycling capacity in young but not mature guinea pigs. *Free Radic. Res.* 36: 567-574.

- Marián, M., Matkovics, B. (1982) Potentiation of the biological activities of daunomycin and adriamycin by ascorbic acid and dimethylsulfoxide. *Experientia* 38: 573-574.
- Marnett, L. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21: 361-370.
- Mayes, P. (1988) Oxidación biológica. En: *Bioquímica de Harper*. Murray, R., Granner, D., Mayes, P., Rodwell, V. El manual moderno. 11ª ed. México. pp. 119-138.
- Meagher, E., Fitzgerald, G. (2000) Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biochem. And Med.* 28 (12): 1745-1750.
- Mimnaugh, E., Trush, M., Bhatnagar, M., Gram, T. (1985) Enhancement of reactive oxygen-dependent mitochondrial membrane lipid peroxidation by the anticancer drug adriamycin. *Biochem. Pharmacol.* 34: 847-856.
- Miura, T., Muraoka, S., Ogiso, T. (1994) Effect of ascorbate on adriamycin- Fe^{3+} induced lipid peroxidation and DNA damage. *Pharmacol. Toxicol.* 74: 89-94.
- Miyata, M., Takano, H., Guo., L., Nagata, K., Yamazoe, Y. (2004) Grapefruit juice intake does not enhance but rather protects against aflatoxin B1-induced liver DNA damage through a reduction in hepatic CYP3A activity. *Carcinogenesis* 25: 203-209.
- Mohri, K., Uesawa, Y. (2002) Effects of furanocoumarin derivatives in grapefruit juice on nifedipine pharmacokinetics in rats. *Pharm. Res.* 18:177-182.
- Moore, K., Roberts, L. (1998) Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* 28: 659-671.
- Mojica Espinosa Raúl. (2002) Tesis: Efecto antigenotóxico del jugo de toronja contra el daño producido por la daunorrubicina in vivo. FESC. UNAM. México. pp. 25-53.

- Myers, C., McGuire, W., Liss, R., Ifrim, I., Grotzinger, K., Young, R. (1977) Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* 197: 165-167.
- Niki, E. (2000) Free radicals in the 1900's: from in vitro to in vivo. *Free Radic. Res.* 33: 693- 704.
- Ng, T., Liu, F., Wang, Z. (2000) Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci.* 66: 709-723.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.
- Pineda, D., Salucci, M., Lázaro, R., Maiani, G., Ferro-Luzzi, A. (1999) Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev. Cub. Alim. Nutr.* 13: 104-111 .
- Pino, P., Gassiot, C., Rodríguez, J., Páez, E., Gundián, J., Verdecia, M. (2000) Uso de la vitamina C en el catarro común. *Acta Med.* 9: 90-95.
- Pita, G. (1997) Actualización: Funciones de la vitamina E en la nutrición humana. *Rev Cub. Alim. Nutr.* 11(1): 46-57.
- Pita, G., Cabrera, A., Serrano, G., Macías, C., Asunción, M. (2000) Vitaminas antioxidantes en un grupo de adolescentes como factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares. *Rev. Cub. Alim. Nutr.* 14: 79-85.
- Proteggente, A., Pannala, A., Paganga, G., Buren, V., Wagner, E., Wiseman, S., Van De Put, V., Dacombe, C., Rice-Evans, C. (2002) The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radic Res.* 36: 217-233.
- Quiles, J., Huertas, J., Battino, M., Mataix, J., Ramírez-Tortosa, C. (2002) Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 180:79-95.
- Ratty, A., Das, N. (1988) Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 39: 69-79.

- Rodríguez, M., Menéndez, R., Trujillo, Y. (2001) Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev. Cub. Med. Milit.* 30: 36-44.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M., Vanella, A. (2000) Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol. Toxicol.* 16: 91-98.
- Sapan, C., Lundblad, R., Price, N. (1999) Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 99-108.
- Shadle, S., Bammel, B., Cusack, B., Knighton, R., Olson, S., Mushlin, P., Olson, R. (2000) Daunorubicin cardiotoxicity: evidence for the importance of the quinone moiety in a free-radical-independent mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 60: 1435-1444.
- Shen, J., Nijima, A., Tanida, M., Horii, Y., Maeda, K., Nagai, K. (2005) Olfactory stimulation with scent of grapefruit oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats. *Neurosci Lett.* 380 (3): 289-294.
- Silva, M., Santos, M., Caroco, G., Rocha, R., Justino, G., Mira, L. (2002) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free Radic. Res.* 36:1219-1227.
- Sun, J., Chu, Y., Wu, X., Liu, R. (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7449-7454.
- The Merck Index. (1996) 17^a ed. Merck and Co. Inc., USA. pp. 1102–1103.
- Tian, R., Koyabu, N., Takanaga, H., Matsuo, H., Ohtani, H., Sawada, Y. (2002) Effects of grapefruit juice and orange juice on the intestinal efflux of P-glycoprotein substrates. *Pharm. Res.* 19: 802-809.
- Tirillini, B. (2000) Grapefruit: the last decade acquisitions. *Fitoterapia* 71 (suppl 1): S29-S37.
- Tirmenstein, M., Reed, D. (1989) Effects of glutathione on the alpha-tocopherol-dependent inhibition of nuclear lipid peroxidation. *J. Lipid Res.* 30: 959-965.

Ueng, Y., Chang, Y., Oda, Y., Park, S., Liao, J., Lin, M., Chen, C. (1999) In vitro and in vivo effects of naringin on cytochrome P450-dependent monooxygenase in mouse liver. *Life Sci.* 65: 2591-602.

Wenger, F., Kilian, M., Ridders, J., Stahlknecht, P., Schimke, I., Guski, H., Jacobi, C., Muller, J. (2001) Influence of antioxidative vitamins A, C and E on lipid peroxidation in BOP-induced pancreatic cancer in syrian hamsters. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 65: 165-171.

Zobali, F., Avci, A., Canbolat, O., Karasu, C. (2002) Effects of vitamin A and insulin on the antioxidative state of diabetic rat heart: a comparison study with combination treatment. *Cell Biochem. Funct.* 20: 75-80.