Anexo

Técnicas y métodos

Dado que la peroxidación lipídica iniciada por radicales libres es un proceso complejo y ocurre en múltiples etapas, diversas técnicas se encuentran disponibles para el estudio de esta reacción. La peroxidación puede ser estudiada mediante la determinación de pérdida de ácidos grasos no saturados, generación de productos primarios o secundarios de degradación o intermediarios de reacción.

En la **tabla 6.1**se resumen los métodos más utilizados para el seguimiento de la reacción de peroxidación lipídica.

Tabla 6.1. Métodos utilizados para detectar y medir peroxidación lipídica no enzimática (modificado de Södergren, 2000).

¿Qué se mide?	**Método**
Pérdida de sustrato	
PUFAs	GC/HPLC
Incorporación de oxígeno	Electrodo de oxígeno
Intermediarios de reacción	
Radicales lipoperoxilos	Quimioluminiscencia
Productos primarios	
Hidroperóxidos lipídicos totales	Ensayo FOX- Absorbancia 550-600 nm
	Oxidación de ioduro- Absorbancia 358 nm
	Glutatión peroxidasa
	Ciclooxigenasa
Hidroperóxidos lipídicos individuales	HPLC-Quimioluminiscencia
	GC-MS/HPLC
Dienos conjugados	Absorbancia 230-235 nm
	HPLC- Absorbancia 230-235 nm
	Espectroscopía de derivados secundarios
Productos secundarios de degradación	
Hidrocarburos gaseosos	GC
TBARS/MDA	Ensayo de TBARS- Absorbancia 532-535 nm
	Ensayo de TBARS- Fluorescencia
	Ensayo de TBARS - HPLC- Absorbancia 532-535 nm
	Ensayo de TBARS - HPLC- Fluorescencia
Aldehídos	GC-MS/HPLC/Anticuerpos/Fluorescencia
F_2-isoprostanos	GC-MS

	Enzimoinmunoensayo
	Radioinmunoensayo

GC: cromatografía gaseosa; HPLC: cromatografía líquida de alta performance; FOX: oxidación con Fe^{2+} en naranja de xilenol, MS: espectroscopía de masas; TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; MDA: malondialdehído y TBA: ácido tiobarbitúrico.

Por otro lado, existen diversos ensayos para determinar la actividad secuestradora de radicales de varios compuestos. La necesidad de identificar antioxidantes, que pueden secuestrar varios radicales libres y, por lo tanto, prevenir múltiples enfermedades, puede cubrirse por ensayos *in vitro* simples, sin embargo, los resultados obtenidos con estos ensayos deben ser confirmados con sistemas *ex vivo* e *in vivo.*

A continuación se describen las técnicas utilizadas en el presente trabajo de tesis:

Espectrofotometría UV-visible

Un espectro de absorción es un registro de la intensidad de la absorción de luz por una muestra en función de la longitud de onda de la radiación incidente. Éste muestra qué longitudes de onda son absorbidas por la molécula en estudio al pasar de niveles de menor a mayor energía. Las bandas observadas dan información sobre las diferencias energéticas entre los estados electrónicos de una molécula. Un espectro de absorción UV-visible no proporciona una clara identificación de un compuesto. Sin embargo, es muy útil para observar cambios en los grupos funcionales de una molécula, debido a que es muy sensible a ellos. Por ejemplo, las distintas formas ácido-base de una misma sustancia pueden claramente ser distinguidas por las diferencias en sus espectros de absorción. Para obtener un espectro de absorción se requiere de un equipo que posea una fuente de luz estable, y un dispositivo con capacidad de variar la longitud de onda en forma continua en la región UV-visible del espectro electromagnético. Debe poseer también un detector capaz de responder linealmente con la intensidad de la radiación transmitida a través de la muestra. La muestra puede encontrarse en fase gaseosa, líquida o sólida, pero usualmente se encuentra en soluciones diluidas, contenidas en celdas de vidrio o cuarzo. La celda debe ser transparente a la radiación, por ello el uso de celdas de cuarzo es esencial para longitudes de onda menores que 300 nm. Si la muestra se encuentra en solución, debe realizarse una corrección por el solvente, debido a que el mismo puede presentar absorción (Dántola, 2008).

Con los datos obtenidos por esta técnica se realizaron gráficas de absorbancia versus tiempo para distintas longitudes de onda (λ) (entre 200 y 300 nm). El análisis de estas gráficas

permite evaluar algunos aspectos cinéticos del proceso estudiado. Por ejemplo, observar si existen una o varias etapas de reacción, detectar en qué momento se producen cambios en las pendientes, etc.

Los cambios espectrales más notorios descriptos en la peroxidación de liposomas (capítulos 4 y 5) se observaron como una disminución entre 200 – 215 nm (desaparición de enlace metilénico entre dos dobles enlaces), aumento entre 230 – 240 nm (formación de dienos conjugados) y aumento entre 260 – 280 nm (aparición de trienos conjugados) (Buege y Aust, 1978). Dienos y trienos conjugados surgen tras el reordenamiento de los dobles enlaces del radical lipídico formado por acción de un radical libre iniciador. Los parámetros cinéticos obtenidos mediante esta técnica brindan información acerca de la actividad antioxidante de los diferentes compuestos estudiados.

Quimioluminiscencia

El estudio sistemático de la cinética de reacción de la peroxidación lipídica en membranas ha demostrado que este proceso, si bien es complejo, puede ser descripto por un conjunto de reacciones agrupadas en cuatro etapas generales (Vladimirov y col, 1980) (**Figura 6.1**):

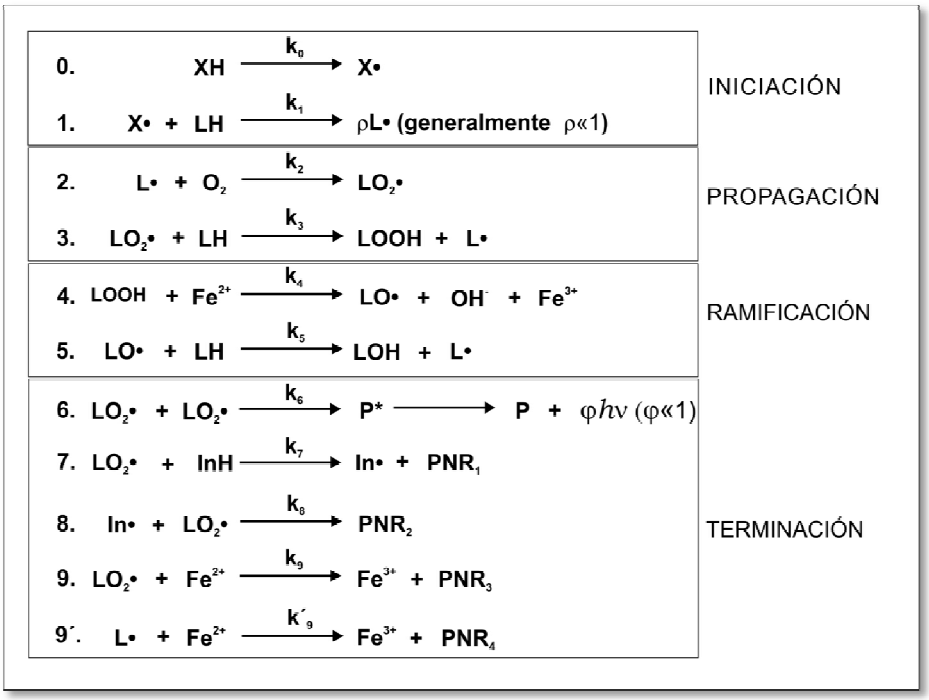

Figura 6.1. Esquema de las principales reacciones involucradas en el proceso de peroxidación lipídica. XH: iniciador de la cadena de peroxidación; X•: radical

libre del iniciador; LH: lípido; L•, LO•, LO_2•: radicales libres producidos a partir de LH; LOOH: hidroperóxido lipídico; InH: inhibidor (antioxidante); In•: radical libre del inhibidor; LOH, P, PNR_n: productos no radicales (tomado de Vladimirov y col, 1980).

1. Iniciación. Se generan radicales primarios de ácidos grasos polinosaturados (L•) como resultado de la acción de radicales iniciadores (X•) (**Reacciones 0** y **1**).

2. Propagación (**Reacciones 2** y **3**).En esta etapa el radical lipídico (L•) formado incorpora oxígeno molecular a su estructura para formar radical lipoperoxilo (LOO•). El radical LOO• puede atacar nuevas moléculas de lípido (LH) generando una reacción en cadena.

La velocidad de la peroxidación lipídica es proporcional a la concentración de radicales L• y LOO• que dan lugar a la reacción en cadena, mientras que la relación [L•]/[LOO•] en el estado estacionario depende de la relación entre las constantes k_2 y k_3 y de la concentración de oxígeno en el medio. La velocidad de reacción (*w*) aumenta con la concentración de PUFAs (LH) y depende del estado físico de la bicapa lipídica.

$$w = -\frac{d[LH]}{dt} = k_3[LH][LO_2^{\bullet}] = k_2[O_2][L^{\bullet}]$$

3. Ramificación de la cadena. Hay evidencias de que en membranas biológicas esta etapa involucra al ión Fe^{2+} no hemínico (**Reacción 4)**

4. Terminación. Se conocen al menos tres formas de cortar la reacción en cadena: interacción de dos radicales (**Reacción 6**), interacción de un radical con un metal de transición (**Reacción 9** o **9´**) y reacción entre un radical y una molécula de "antioxidante", es decir un compuesto cuyo radical sea incapaz de continuar la cadena de reacción (**Reacción 7**).

La investigación sobre la cinética de reacción de la lipoperoxidación fue significativamente estimulada por el descubrimiento de la quimioluminiscencia que acompaña a este proceso (Vladimirov y col, 1966). La generación espontánea de quimioluminiscencia en suspensiones mitocondriales y de microsomas hepáticos ligada a la reacción de lipoperoxidación, puede ser y ha sido interpretada como un indicador de la generación de oxígeno singlete (Howes y Steele, 1971). Sin embargo, la generación de otro producto de la dismutación del radical lipoperóxido, la cetona excitada, también fue propuesta como fuente de luminiscencia en la reacción de peroxidación (Zhuravlev, 1962; Zhuravlev, 1966) según el siguiente esquema de reacción:

$$LO_2^{\bullet} + LO_2^{\bullet} \rightarrow LO^{*} + LOH + O_2$$

donde $LO_2^{\bullet}$: radical peroxilo, LO^{*}: cetona activada, LOH: alcohol lipídico, O_2: oxígeno

La **reacción 6** es particularmente interesante dado que está acompañada de emisión de luz cuya intensidad (I) puede estimar la concentración de LOO• según la siguiente ecuación:

$$I = K\phi k\,[LOO\bullet]^2$$

donde ϕ representa la eficiencia cuántica de quimioluminiscencia y k es un coeficiente que depende de la sensibilidad neta del instrumento (Vladimirov y col, 1980).

Antioxidantes, tales como α-tocoferol reaccionan directamente con radicales libres que participan de la cadena de peroxidación (**Reacción 7**), evitando así la fase de propagación. De esta manera, la reacción entre un radical LOO• y una molécula de antioxidante (InH) previene la emisión de luz.

Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La utilización de la reacción con TBA para medir la peroxidación lipídica se remonta al año 1944 cuando Kohn y Liversedge (1944) observaron que tejidos animales incubados aeróbicamente con TBA producían un color rosado. Bernheim y colaboradores (1948) descubrieron que el color rosado se debía a un complejo formado por productos de oxidación de ácidos grasos no saturados y TBA. Yu y Sinnhuber (1957) reportaron que malondialdehído (MDA) era la principal sustancia reactiva al TBA aunque más tarde otros investigadores informaron que otros productos de oxidación podían estar involucrados, como aldehídos no saturados (por ej.: 4-hidroxialquenales) y varios precursores de estas sustancias no volátiles no identificados.

La principal sustancia reactiva al TBA, el malondialdehído, es un dialdehído de tres carbonos altamente reactivo, generado como uno de los principales bioproductos de la peroxidación de ácidos grasos polinosaturados (Janero, 1990) y también durante el metabolismo de ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas (Marnette, 1999). MDA puede combinarse con diversos grupos funcionales de proteínas, lipoproteínas, ARN y ADN (Sevilla y col, 1997). La determinación de los niveles de MDA en materiales biológicos es un método conveniente, sensible y ampliamente utilizado para estimar cuantitativamente la extensión de la peroxidación lipídica. Se han descripto diversas técnicas para determinar MDA, como el ensayo de TBA espectrofotométrico, HPLC Kakuda y col, 1981) y cromatografía

gaseosa. La determinación de MDA por este último precisa de su derivatización (Hamberg y col, 1968; Lakshminarayana y Cornwell, 1986; Tomita y col, 1990).

El método espectrofotométrico del TBA es el más comúnmente utilizado para la cuantificación de MDA. La reacción ocurre por ataque del MDA sobre el grupo metileno activo del TBA (**Figura 6.2**). Un mol de MDA reacciona con dos moles de TBA en medio ácido y a alta temperatura. La velocidad de esta reacción depende de la concentración de TBA, la temperatura y el pH. El pigmento generado posee un pico máximo de absorbancia a 532-535 nm y otro secundario a 245-305 nm (Sinnhuber y col, 1958). El ensayo de TBA puede determinarse también por un procedimiento espectrofluorométrico dado que el espectro de excitación del pigmento TBA-MDA posee un máximo a 532 nm (Yagi, 1984). La especificidad de este método es similar al del método espectrofotométrico, debido a que otros compuestos originados en la degradación de peróxidos lipídicos también pueden generar fluorescencia (Shimasaki y col, 1977).

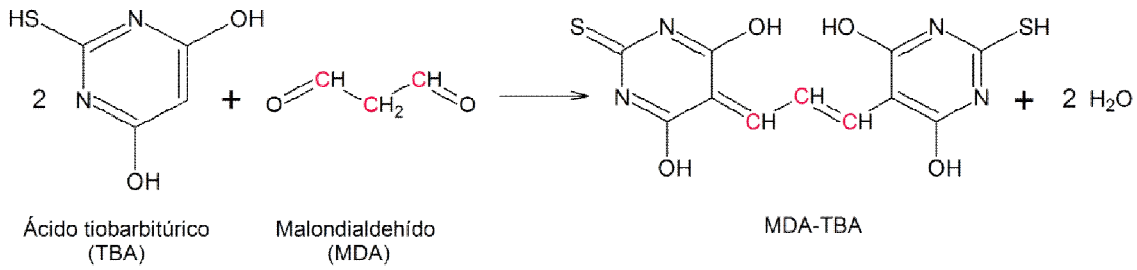

Figura 6.2. Esquema de la reacción entre malondialdehído y ácido tiobarbitúrico.

El principal problema con el ensayo de TBARS es su falta de especificidad. TBA reacciona con una variedad de aldehídos, no sólo con aquellos formados como resultado de la peroxidación lipídica sino también con glucosa, desoxirribosa, ácido ascórbico, homocisteína y algunos aminoácidos tales como, prolina, arginina y glutamato, por esta razón el análisis en fluidos biológicos por este método resulta complejo (Spickett y col, 2010). Otra limitación del ensayo de TBA es que el MDA y otros productos de cadena corta no son estables por largos períodos de tiempo. Esto se debe a que la oxidación de estos compuestos genera alcoholes y ácidos orgánicos que no son determinados por el ensayo de TBA (Tarladgis y Watts, 1960; Fernández y col, 1997).

En el presente trabajo de tesis esta técnica aportó información útil para el monitoreo de la reacción de peroxidación. Las interferencias comunes de esta técnica (azúcares, proteínas, aminoácidos, ácido ascórbico, etc) no constituyeron un problema ya que al utilizar

sistemas puramente lipídicos las sustancias reactivas al TBA sólo provinieron de la reacción de peroxidación de los lípidos.

Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas

El análisis de ácidos grasos requiere de las siguientes etapas:

a. Obtención de los lípidos por extracción con mezcla de solventes.
b. Derivatización de los ácidos grasos.
c. Análisis por cromatografía gaseosa.

a. El primer punto fue realizado mediante el llamado método de Folch (Folch y col, 1957) que emplea una mezcla de cloroformo: metanol (2:1). Con esta mezcla se realizó la extracción de lípidos de las retinas bovinas con los que se prepararon los liposomas y los lípidos de los liposomas ya preparados.

b. Los métodos de derivatización se pueden dividir en cuatro categorías (Christie, 1989):

1) transesterificación ácida: HCl en metanol 5% p/v, H_2SO_4 en metanol 1 a 2% v/v, cloruro de acetilo en metanol, BF_3en metanol

Ventajas

Todos estos métodos convierten los acilgliceroles o triglicéridos y ácidos grasos libres en ésteres metílicos. El más popular tal vez es el BF_3 12-14 % p/v en metanol por usar el primer procedimiento aceptado por AOCS. Es un método rápido.

Desventajas

Forma compuestos ajenos o interferentes. No es útil para aceites de semilla que contienen ácidos grasos inusuales como epoxi, ciclopropeno, etc. Reacciona con colesterol formando colesterolmetiléster y colestadieno. El reactivo es caro e inestable. Debe refrigerarse. El empleo de BF_3antiguo o concentrado produce pérdidas de ácidos grasos poli no saturados.

2) transesterificación básica: Metóxido de sodio en metanol anhidro

Ventajas

Rápido, puede efectuarse a temperatura ambiente. Convierte los triglicéridos o acilgliceroles directamente a ésteres metílicos (transesterificación). No produce isomerización de dobles enlaces. No transesterifica ni esfingolípidos ni colesterol.

Desventajas

No convierte los ácidos grasos libres a ésteres metílicos. Por lo tanto no sirve para muestras de materias grasas con elevada acidez. Debe trabajarse en medio anhidro. La presencia de agua produce saponificación lo cual resulta en pérdida de ácidos grasos. El uso prolongado puede alterar la composición en ácidos grasos. Alta concentración de álcali y alta temperatura puede llevar a la formación de ácidos grasos conjugados.

3) diazometano:

Ventajas

Es un método rápido casi instantáneo a temperatura ambiente. Esterifica los ácidos grasos libres en presencia de metanol. El exceso de reactivo se elimina por evaporación bajo N_2.

Desventaja

Reactivo muy tóxico. Se puede usar sólo si es estrictamente necesario. Es explosivo. Forma compuestos extraños reaccionando con dobles enlaces o grupos carbonilos.

4) otros métodos de esterificación: en la búsqueda de reactivos que metilen más rápidamente a los ácidos grasos se han desarrollado por ej: sales cuaternarias de amonio, cloruro de acetilo en metanol, guanidina y sus derivados alquilados en metanol, etc (Christie, 1989).

Para derivatizar los ácidos grasos provenientes de retina y de liposomas preparados con lípidos de la misma, seleccionamos el método que incluye BF_3/metanol como reactivo metilante, por poseer menos desventajas que los demás reactivos, ser un reactivo ampliamente utilizado en la bibliografía consultada, por su fácil manipulación y porque los resultados que obtuvimos con otros reactivos tales como NaOH/metanol y HCl/metanol no tuvieron diferencias significativas con los obtenidos empleando BF_3.

c. La técnica de cromatografía gaseosa es una forma de cromatografía de partición en la cual la fase móvil es un gas y la fase estacionaria es un líquido. La muestra es inyectada en la fase gaseosa que es volatilizada y pasa a la fase líquida, que se encuentra retenida en la columna. Los componentes de la muestra pasan diferentes tiempos entre la fase móvil y la estacionaria dependiendo de sus afinidades relativas por esta última y emergen al final de la columna exhibiendo picos de concentración, con un distribución idealmente Gaussiana. Estos picos son detectados por algún sistema que convierte la concentración del componente en la fase gaseosa en una señal eléctrica, que es amplificado y registrada.

Un cromatógrafo básico posee tres componentes esenciales: el inyector (por el que se introduce la muestra a la columna), la columna en sí misma (que contiene la fase estacionaria y a través de la cual pasa la fase móvil) y el detector.

Las *columnas* pueden ser empacadas o recubiertas y el principal factor a tener en cuenta es la selectividad de la misma para la separación requerida. El principal factor que influencia la separación es la polaridad de la fase líquida.

Existen numerosos *detectores* disponibles. El utilizado en este trabajo de tesis consiste en un detector de masa que permite, además de la cuantificación, la identificación de los compuestos. El principio en que se basa esta técnica es que los compuestos que eluyen en la fase gaseosa son bombardeados por electrones formando iones cargados positivamente que se fragmentan de distintas maneras generando especies iónicas de menor tamaño. Estos fragmentos llegan a un campo electromagnético que los separa según su relación masa/carga (m/z). Ellos son recolectados por el detector en orden creciente de esta relación m/z y la corriente iónica es amplificada generando la señal. Al pico mayoritario se le asigna un valor de intensidad arbitrario igual a 100, y las intensidades de los demás iones se normalizan a éste. El ión formado de la molécula es denominado ión molecular (M+). El gráfico de intensidad iónica en función de la relación m/z se conoce como espectro de masas.

Las moléculas no se fragmentan de forma arbitraria sino que tienden a romperse en los enlaces más débiles, tales como aquellos adyacentes a grupos funcionales específicos, o de acuerdo a ciertas reglas complejas que han sido formuladas empíricamente a partir de estudios con compuestos modelos. Es posible deducir la estructura del compuesto original a partir de los fragmentos producidos. Para compuestos cuyos resultados son confusos, se pueden comparar sus espectros de masas con aquellos compuestos con propiedades similares. Estas comparaciones se facilitan enormemente con ayuda de programas informáticos especiales. En este trabajo de tesis, los espectros de masa obtenidos son comparados a través del software TurboMass, provisto por la empresa Perkin Elmer, con los de la biblioteca NIST lo que nos permitió identificar los diferentes derivados de ácidos grasos estudiados.

Ensayo de DPPH

El ensayo de DPPH es una de las diversas técnicas empleadas para estimar la actividad secuestradora de radicales de compuestos específicos o extractos naturales (Blois, 1958). Esta técnica espectrofotométrica emplea el radical 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH), que posee un espectro de absorbancia característico, con un máximo de absorbancia a 515 nm (**Figura 6.3**). La reducción de DPPH provocada por un antioxidante (AH) o un radical, implica disminución en su absorbancia a 515 nm (Brand-Williams y col, 1995).

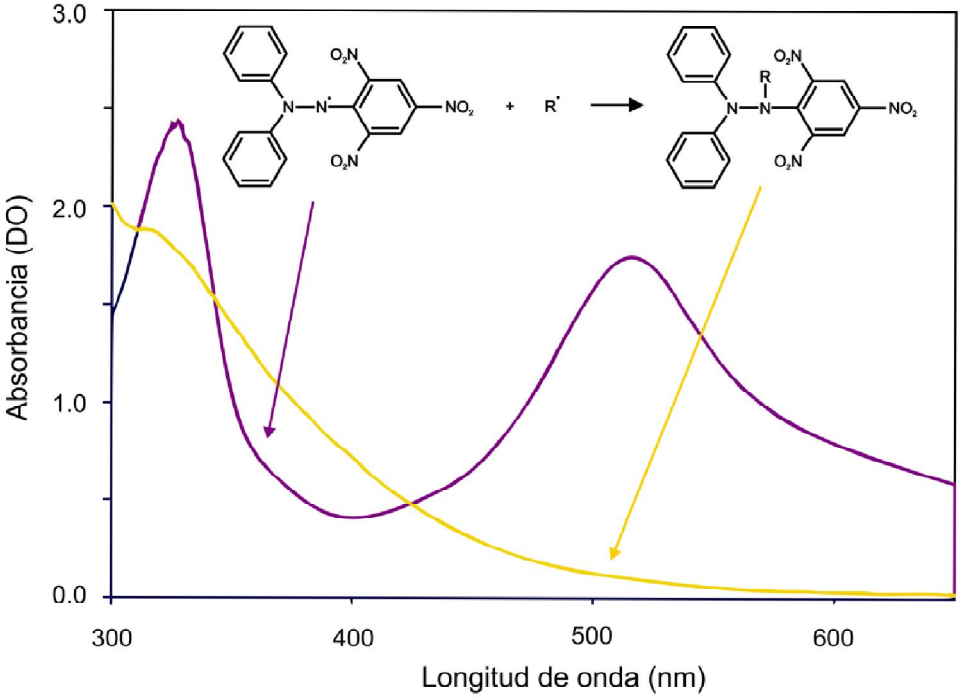

Figura 6.3. Estructuras y espectros del radical DDPH• (línea violeta) y de DPPH reducido (línea amarilla)

Se creía que el ensayo de DPPH involucraba una reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno, pero Foti y colaboradores sugirieron que la reacción que tiene lugar corresponde a una transferencia de electrones (Foti y col, 2004). Los autores determinaron que el paso determinante de la velocidad para esta reacción consiste en un proceso rápido de transferencia de electrones de un anión fenóxido al DPPH. Que el DPPH sustraiga un átomo de hidrógeno a partir del antioxidante fenólico neutral resulta una vía secundaria de reacción, dado que ésta ocurre muy lentamente en solventes tales como metanol y etanol. Además, los autores indicaron que ácidos o bases presentes como contaminantes en el solvente pueden influenciar dramáticamente el equilibrio de ionización de fenoles, alterando los valores de las constantes de velocidad de reacción medidas.

Además de las diferencias mecanísticas entre la reacción de transferencia de átomos de hidrógeno que ocurre normalmente entre antioxidantes y radicales peroxilos, DPPH es un radical nitrogenado de larga vida, que no guarda relación con los radicales peroxilos altamente reactivos involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilos pueden reaccionar lentamente o, aún más, ser inertes

frente al DDPH (Huang y col, 2005). A pesar de estas desventajas, el ensayo de DPPH sigue siendo una técnica ampliamente utilizada debido a su simplicidad y a la ventaja de emplear un radical libre estable disponible comercialmente. Es altamente reproducible y comparable con otros métodos como ABTS, reducción de anión superóxido e inhibición de peroxidación lipídica (Villaño y col, 2007).