



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MEXICO

CAMPUS CHAPULTEPEC

**ESCUELA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
INCORPORADA A UNAM**

**“OBTENCIÓN DE AGUA ELECTROLIZADA Y SU EFECTO
EN LA MEMORIA DE RATAS VIEJAS CON ESTRÉS
OXIDATIVO”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P r e s e n t a:
MARIANA GUADARRAMA ORTÍZ

Director de tesis: M. en C. Agustín Palma de la Cruz.
Dr. Miguel Saloma Terrazas.

MEXICO, D. F.

2006



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.

Con todo mi respeto y admiración doy gracias al Profesor Agustín Palma de la Cruz y al Dr. Miguel Saloma Terrazas del área de Electroquímica de la Facultad de Química de la UNAM., que con su valiosa intervención me permitieron llegar al final de este proyecto.

Agradezco a la Dra. Selva Rivas que se encuentra en el área de Neurología de la Facultad de Medicina de la UNAM, por sus conocimientos ya que gracias a ellos me permitió la realización de esta tesis, así también al personal que labora con ella sin su ayuda me hubiera sido difícil su realización.

ÍNDICE

	Página
1.- JUSTIFICACION	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ABREVIATURAS	3
4. HIPÓTESIS	4
5. OBJETIVOS	5
6. ANTECEDENTES	
6.1 Electroquímica	6
6.1.1 Electrólisis del agua	8
6.2 Usos del agua reducida	9
6.3 Usos del agua oxidada	11
6.4 Estrés oxidativo	12
6.4.1 Radicales libres y oxidantes	14
6.4.2 Especies reactivas de oxígeno	16
6.4.3 Ozono (O ₃)	16
6.4.4 Daño oxidativo	17
6.4.5 Antioxidantes	20
6.4.5.1 Defensas antioxidantes en el cuerpo humano	21
6.4.5.2 Defensas antioxidantes exógenas	22
6.4.6 Peroxidación de lípidos	23
6.4.6.1 Determinación de peroxidación de lípidos (malondialdehído)	27
6.4.7 Glutación peroxidasa	28
6.4.8 Aumento del daño oxidativo con envejecimiento	29
6.4.9 El cerebro propenso a estrés oxidativo	29
6.4.9.1 Consecuencias del estrés oxidativo	30
6.4.9.2 Daño neurodegenerativo	30
6.4.10 Aprendizaje en ratas	31

7. DESARROLLO EXPERIMENTAL	
7.1 Reactivos y disolventes	33
7.2 Equipo y aparatos	33
7.3 Material biológico	33
7.4 Métodos	
7.4.1 Estabilidad del agua	35
7.4.2 Administración de agua electrolizada a ratas	37
7.4.3 Prueba de memoria	39
7.4.4 Determinación de peroxidación de lípidos en homogenizados de tejidos cerebrales con ácido tiobarbitúrico (Malondialdehído)	40
7.4.5 Determinación de glutatión peroxidasa en homogenizados de tejidos cerebrales	41
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
8.1 Estabilidad del agua	42
8.2 Administración de agua electrolizada a ratas	45
8.3 Influencia del agua electrolizada sobre la mortalidad de las ratas	46
8.4 Prueba de memoria	47
8.5 Determinación de peroxidación de lípidos en homogenizados de tejidos cerebrales con ácido tiobarbitúrico (Malondialdehído)	49
8.6 Determinación de glutatión peroxidasa en homogenizados de tejidos cerebrales	50
9. CONCLUSIÓN	51
10. BIBLIOGRAFIA	52
11. ANEXO	54

1. JUSTIFICACION

Se ha estudiado en las últimas décadas que el estrés oxidativo es una de las causas que desencadena enfermedades neurodegenerativas debido a que los oxidantes cuando se encuentran en cantidades anormales causan en la célula su envejecimiento y posteriormente su muerte. La importancia de los oxidantes en la neurodegeneración se está incrementando en forma evidente.

Por tal motivo es importante encontrar una terapia mediante el uso de antioxidantes para mediar los oxidantes para reducir o evitar que causen daño. Se ha encontrado en artículos que el agua reducida obtenida electrolíticamente es antioxidante posiblemente debido a su radical hidrógeno que tiene en su composición, pero aún no se ha estudiado lo suficiente como para asegurar esto.

Se llevó a cabo este proyecto con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas para la obtención de agua electrolizada con ciertas propiedades fisicoquímicas para la administración a un modelo animal sometido con estrés oxidativo, esto con el objeto de saber con cual de los distintos tipos de agua electrolizada se observa un mejoramiento ante el estrés oxidativo.

2. INTRODUCCIÓN

Mientras el oxígeno es vital para la existencia de todos los organismos aeróbicos, bajo ciertas circunstancias las especies reactivas y derivados de oxidantes son nocivos para las moléculas biológicas, provocando daño en las células y posteriormente su muerte. Un desequilibrio entre los oxidantes y la defensa antioxidante a favor del oxidante constituye la base para el estrés oxidativo.

La importancia de los oxidantes en la neurodegeneración se está incrementando en forma evidente. La incorporación de los radicales libres en muchos desórdenes cerebrales abre la posibilidad de una prevención o terapia mediante el uso de antioxidantes.

Para determinar la validez e importancia del estrés oxidativo en las reacciones biológicas, es esencial caracterizar y cuantificar sustancias, biomoléculas, y enzimas en el equilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes. Por un lado es posible identificar, cuantificar y localizar a los oxidantes y los antioxidantes. Pero por otro, es indispensable la cuantificación del daño que infligió en biomoléculas como los lípidos, proteínas y DNA por los distintos oxidantes. Uno de los posibles antioxidantes es el agua reducida obtenida electrolíticamente.

En la literatura se han reportado distintos usos médicos del agua electrolizada, tanto reducida (AR) como oxidada (AO) en animales (incluido el hombre).

En este trabajo se llevó a cabo la producción y estabilidad de ambos tipos de agua electrolizada. La electrólisis del agua se realizó en una celda dividida de flujo continuo y la estabilidad se determinó midiendo el pH, potencial redox y conductividad.

Después, se administró AR, AO, y mezcla de ambas (AM) en ratas viejas a las que se les indujo estrés oxidativo, esta inducción se llevó a cabo mediante la administración de ozono diariamente por 1 mes. La administración de este tipo de agua se hizo con el objeto de ver su influencia en la mortalidad, la memoria y los niveles de estrés oxidativo en dichas ratas. La memoria se determinó midiendo latencia de adquisición, de escape y posteriormente memoria a corto y largo plazo. Los niveles de estrés oxidativo se determinaron cuantificando peroxidación de lípidos y glutatión peroxidasa en homogenizados de tejidos cerebrales.

3. ABREVIATURAS

Ac.	Acuoso
AM.	Agua mezcla
AR.	Agua reducida por electrolizada (catódica)
AO.	Agua oxidada por electrolizada (anódica)
C.	Agua sin electrolizar (control)
CA.	Chemical abstract
CAT.	Catalasa
DTNB.	Ácido 5,5'-ditiobis (2nitrobenzoico)
G.	Gas
GPx.	Glutación peroxidasa
GSH.	Glutación reducido
L.	Líquido
MDA.	Malondialdehído
pH	Potencial redox
PUFAs.	Ácidos grasos poliinsaturados
RL.	Radical libre
RNOS.	Especies reactiva de oxido nitroso
ROS.	Especies reactivas de oxígeno
SOD.	Superóxido dismutasa
TBA.	Ácido tiobarbitúrico
TNB.	5-Tio-2-nitrobenzoato

4. HIPÓTESIS

Basándonos en la información recabada referente a que el AR tiene un posible carácter antioxidante *in vitro*, se espera el mejoramiento en la memoria, una menor peroxidación de lípidos y una mayor cantidad de glutatión peroxidasa al modelo animal al cual se le administre ésta.

Por otro lado, al modelo animal que se le administre AO se esperan niveles altos en la peroxidación de lípidos, menor glutatión peroxidasa y no se mostrará un mejoramiento en la memoria

5. OBJETIVOS

GENERAL

- Obtención de AO, AR y AM por ruta electroquímica.
- Determinar la influencia del agua electrolizada en ratas viejas con estrés oxidativo.

PARTICULAR

- Determinar las variables experimentales en la producción de agua electrolizada en celda dividida de flujo continuo.
- Ver la influencia del tiempo en la estabilidad del agua electrolizada.
- Inducir estrés oxidativo en ratas viejas mediante la administración de ozono diariamente.
- Administración de agua electrolizada en ratas viejas con estrés oxidativo durante 30 días.
- Extracción de órganos de las ratas estudiadas.
- Medir la peroxidación de lípidos y glutatión peroxidasa en los homogenizados de tejidos cerebrales de ratas con estrés oxidativo.

6. ANTECEDENTES

6.1 Electroquímica

La electroquímica nació de la unión entre la química y la electricidad. El origen de la electroquímica se remonta desde 1791 en Bologna, Italia, donde Luigi Galvani diseccionó a una rana: “Una persona que estaba ayudándome tocó ligeramente y por casualidad con su bisturí un punto de los nervios de la rana, entonces se observó de repente que todos los músculos se contrajeron”. El descubrimiento de Galvani fue continuado 9 años después por su compatriota Volta, el cual comunicó a la Royal Society en Londres una cosa asombrosa: Si uno usa una membrana de cartón para separar platos de plata de unos de zinc, y se moja la membrana con agua salada, fluye una corriente eléctrica. Volta llamó a su dispositivo “El órgano eléctrico artificial”. Michael Faraday en 1834 descubrió la relación entre la cantidad de electricidad consumida y la cantidad de metal producido en forma sólida a partir de una disolución.¹

La electroquímica se define como “la rama de la química que estudia la conversión entre la energía eléctrica y la energía química y viceversa”.

Faraday propuso que el paso de la corriente se acompaña por la migración de partículas cargadas (iones), las cuales se desplazan a uno u a otro polo dependiendo de su signo. A estos iones les llamó *electrolitos*. El fenómeno complejo que induce el paso de una corriente bajo la acción de una tensión eléctrica aplicada externamente a conductores de este tipo, y las reacciones químicas asociadas, las llamó *electrólisis*. Los iones, los cuales son los acarreadores de las cargas eléctricas son divididos en cationes (cargas positivas que migran hacia el cátodo, electrodo cargado negativamente) y aniones (cargas negativas que migran hacia el ánodo, electrodo cargado positivamente), figura 6.1.

Los *electrodos* son los extremos metálicos del circuito externo que se sumerge en los electrolitos.

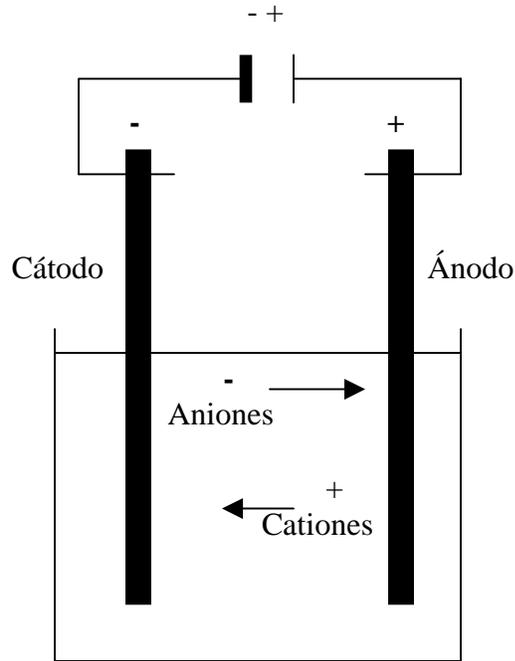


Figura 6.1 Migración de iones en una celda electrolítica.²

Los metales más convenientes para electrodos inertes en los procesos oxido-reducción son platino, iridio, rodium y oro. En algunos casos se utiliza carbón, mercurio, molibdeno o tungsteno.²

Los recipientes donde se efectúan las reacciones de intercambio de electrones se les conocen como celdas galvánicas y celdas electrolíticas. Las celdas galvánicas son con frecuencia empleadas para convertir energía química en energía eléctrica,³ es decir se genera electricidad mediante una reacción redox.⁴

Una celda electrolítica es aquella en la cual las reacciones se llevan a cabo por la imposición de un gran voltaje entre los electrodos de la celda. Estas celdas son con frecuencia empleadas para llevar a cabo las reacciones químicas deseadas a expensas de la energía eléctrica.³

Los procesos electroquímicos son reacciones redox (oxidación-reducción) en las cuales la energía liberada por una reacción espontánea se convierte en electricidad o la energía eléctrica se aprovecha para provocar una reacción química no espontánea. En las reacciones redox se transfieren electrones de una sustancia a otra. El término reacción de oxidación se refiere a la semirreacción que implica la pérdida de electrones. Una reacción de reducción es una semirreacción que implica una ganancia de electrones. La pérdida de electrones durante la oxidación de un elemento se caracteriza por un aumento en su número de oxidación. En la reducción, hay una disminución en el número de oxidación debido a la ganancia de electrones por el elemento. Los agentes oxidantes siempre se reducen mientras que los agentes reductores siempre se oxidan. En una celda electroquímica, el ánodo es, por definición, el electrodo en el que se lleva a cabo la oxidación, y el cátodo es el electrodo en el que ocurre la reducción.⁴

6.1.1 Electrolisis del agua

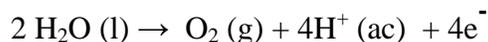
La electrolisis del agua se lleva a cabo para la producción de hidrógeno y oxígeno de alta pureza. Ambos gases también pueden ser producidos por otros métodos, como aire licuado. Sin embargo, el proceso electrolítico tiene las ventajas de que ambos gases se obtienen en grandes cantidades y con una alta pureza utilizando un equipo simple.

El agua destilada no puede usarse como tal para la electrólisis, ya que su conductividad es nula. Por consiguiente es necesario utilizar una disolución diluida de una sal.¹

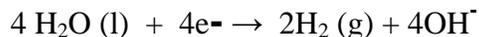
El agua contenida en un vaso en condiciones atmosféricas, no se descompone de manera espontánea para formar hidrógeno y oxígeno gaseosos, porque se requiere de una gran energía para llevar a cabo este mecanismo:



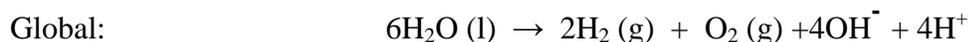
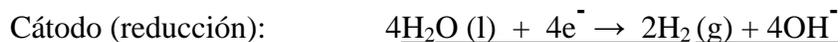
Cuando los electrodos se conectan a una batería o a una fuente de poder, de inmediato empiezan a aparecer burbujas de gas en los dos electrodos. El proceso químico en el ánodo es:



Mientras que en el cátodo se tiene:



La reacción global está dada por:



En la figura 6.2 se muestra la electrólisis del agua en una celda dividida. ⁴

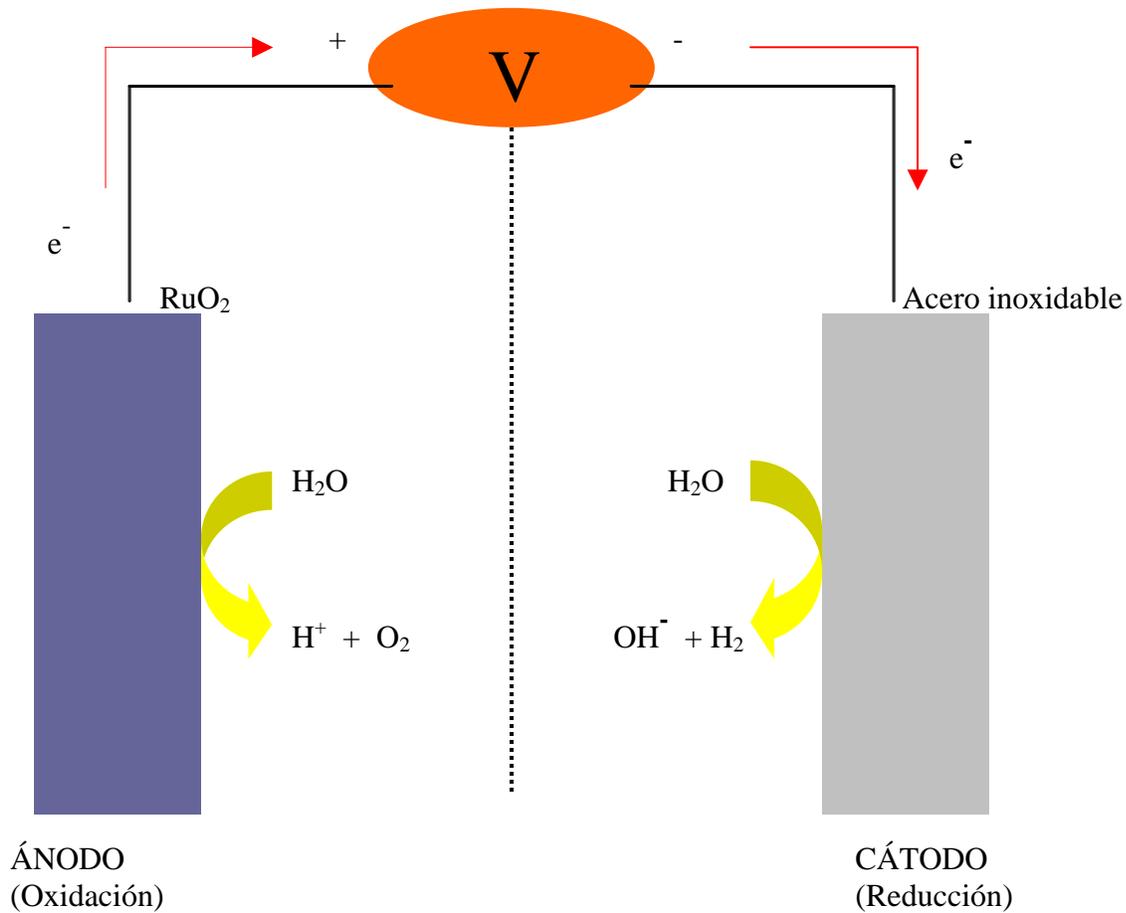


Figura 6.2 Electrólisis del agua en celda dividida

6.2 Usos del agua reducida

Antioxidante

Se ha establecido que las especies reactivas de oxígeno (ROS) provocan daño a las biomoléculas y estructuras celulares, desarrollando una variedad de estados patológicos como la diabetes, cáncer y envejecimiento. Se dice que el AR es antioxidante y se genera por la reducción catódica de la misma. El AR tiene gran cantidad de hidrógeno molecular y puede destruir los ROS *in vitro*. El AR electroquímicamente y las aguas reducidas en forma natural, tales como las de Hita Tenryosui en Japón, Nordenau en Alemania y Tlacote en México posiblemente curan diversos padecimientos. ^{5,6}

Anticáncer

Investigadores de la universidad de Kyshu, Japón encontraron que el AR no solo inhibe el crecimiento de varias células cancerígenas humanas (cultivos de agar) sino también el de Gram - (por ejemplo *E.Coli*). El efecto supresivo del AR sobre el crecimiento de células cancerígenas depende de los tipos de células, agresividad de células cancerígenas y los métodos de producción de AR. Los investigadores asumieron que la eliminación de ROS por el AR generaron daño en los fenotipos del tumor sin afectar seriamente las células normales.^{7,6}

Tratamiento para la diabetes

En la Diabetes tipo 2, ROS causan reducción en la captación de glucosa inhibiendo la ruta de la insulina en células musculares y adipositos. El grupo de Oda demostró que el AR elimina ROS y protege al DNA del daño oxidativo. Estos investigadores japoneses encontraron que AR elimina ROS en los miotubos L6 con respuesta a la insulina y en los adipositos de ratones 3T3/L1. La captación de 1-desoxi-D-glucosa (2-DOG) dentro de ambas células L6 y células 3T3/L1, fue estimulado por AR en la presencia o ausencia de insulina. La actividad tipo insulina del AR fue medida por la activación de quinasa PI-3, resultando en estimulación de la translocación de glucosa (GLUT4) transportado desde el microsoma a la membrana del plasma. Estos resultados sugieren que el AR pueda ser útil para mejorar la Diabetes tipo II.^{8,6}

Tratamiento cutáneo (acné, eczema y psoriasis)

Gary Heesch, investigador norteamericano patentó un método para tratar enfermedades cutáneas como: acné, eczema y psoriasis mediante una disolución de antibiótico con AR. Esta disolución se caracteriza por la ausencia de turbidez y pérdida de la potencia del antibiótico. Cuando se aplica la disolución en al área afectada, el agua se absorbe por la queratina y el antibiótico se pone en contacto ínfimamente con la queratina, después del cual el agua se evapora y el antibiótico se dispersa en el área tratada.⁹

Mejora la microflora intestinal y previene la putrefacción de alimentos

Investigadores japoneses descubrieron que el AR exhibe efectos microbicidas, especialmente en densidades bajas de microorganismos. Esto puede contribuir a prevenir la putrefacción de alimentos o mejorar la microflora intestinal para prevenir la fermentación anormal.¹⁰

Bactericida

Algunas bacterias que se desarrollan en medio ácido como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se inhibe su crecimiento cuando están en contacto con el AR ya que esta tiene pH alcalinos. Por ejemplo, el agua de mar de zonas profundas cuando es electroliza con 0.5A durante 25 minutos genera una solución alcalina en el compartimiento catódico con un pH de 8.84 y un potencial redox de -361. Esta solución es desinfectante y se utiliza como microbicida.¹¹

6.3 Usos del agua oxidada

Desinfectante

Recientemente el uso del agua electrolizada ha despertado gran interés en Japón. Estudios han comprobado la eficiencia de esta agua electrolizada como agente desinfectante en la reutilización de diálisis. El grupo encabezado por Tanaka Noriaki compararon la eficiencia de los distintos tipos de agua electrolizada con otros desinfectantes que se usan con frecuencia. Primero, las diálisis fueron colocadas en distintas disoluciones, AR, AO, agua normal, agua con Diajox-cj al 2% y agua con formalin al 3.8%, los cuales son agentes desinfectantes comerciales que se utilizan con frecuencia en Japón. Se utilizaron diálisis de 2 tipos, una membrana de acetato de celulosa y una membrana de polisulfona. Las diálisis fueron limpiadas y desinfectadas con las diferentes soluciones, se dejó pasar 48 horas. Posteriormente, las diálisis fueron limpiadas con una solución salina (NaCl al 0.9%). Estas membranas fueron analizadas con un microscopio para observar la presencia de contaminantes biológicos. Finalmente se observó que las diálisis que fueron tratadas con las aguas electrolizadas, los microorganismos no fueron detectados en un lapso de 30 y 240 minutos. Cuando se trataron con Diajox-cj al 2% mostraron altos niveles de contaminantes en la diálisis de membrana de celulosa.¹³

Cuando se produce agua electrolizada en el cátodo se produce AR y simultáneamente en el lado del ánodo se genera AO. Dependiendo de las condiciones experimentales, el AR puede salir con un pH alto (alrededor de 11) y un potencial redox extremadamente bajo (-800mv). Este tipo de agua aún no ha sido bien estudiada, pero el AO se ha comprobado que es efectiva para desinfectar vegetales. Para llevar a cabo el tratamiento, simplemente se remojan las verduras en AO. Pero también se ha encontrado que para una desinfección más efectiva, los vegetales se lavan con AR por 1 minuto y después se desinfectan en AO por 5 minutos. Este efecto es notable en pepinos, lechugas y col.¹⁴

Inactivación de microorganismos patógenos (Bacterias, Virus, Hongos)

El agua AO tiene potencial redox de 1148-1165 mV, pH entre 2.08 y 2.40 y contiene de 23.37 a 54.28 mg/L de cloro residual. Es un eficiente germicida, elimina *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y esporas de *Bacillus subtilis* en suspensión. Estos fueron expuestos en una solución de agua oxidada entre 1, 3 y 60 minutos, pero se requirió de 10, 10, 240 minutos para matar al 100% de los 3 tipos de bacterias, respectivamente.¹⁵

Se realizó un estudio para ver el papel del potencial redox en el agua electrolizada y agua oxidada modificada químicamente para la inactivación de patógenos en alimentos. Sus resultados sugieren que es posible simular el agua electrolizada por una modificación química del agua desionizada observando que el potencial redox de la solución es el factor más importante que afectan la inactivación microbiana.¹⁶

Se ha demostrado que el AO con un potencial redox de 1153-1165mV, pH de 2.21- 2.27 y con un contenido de 50.29-58.24 mg/L de cloro mata a 99.91% de *Candida albicans* cuando esta se expone por 3 minutos al AO y se muere el 100% cuando se expone por 20 minutos.¹⁷

Investigadores norteamericanos de la Universidad de Georgia estudiaron el efecto antimicrobiano del AO para la inactivación del *Campylobacter jejuni* durante el lavado de granjas para aves. Una inactivación completa de *Campylobacter jejuni* ocurre alrededor de los 10 segundos después de su exposición a AO, la cual contenía 50mg/L de cloro residual. La actividad también se observó cuando el AO se diluye (25mg/L cloro residual) y también se inhibe el crecimiento de *C. jejuni* en un 10UFC/mL. Esta dilución es menos efectiva que el concentrado. Estos estudios han demostrado que el AO no solamente inhibe el crecimiento de este microorganismo sino que también puede prevenir la contaminación cruzada durante el proceso de lavado.¹⁸

6.4 Oxígeno

El oxígeno existe en el aire como una molécula diatómica, O₂, llamado oxígeno molecular. Los organismos unicelulares aerobios, animales y plantas requieren de O₂ para la producción eficiente de energía.

El O₂ apareció en cantidades significantes en la atmósfera de la Tierra hace 2.5 x 10⁹ años atrás y las evidencias geológicas sugieren que esto fue debido a la evolución de la fotosíntesis en algas verde-azul (cianobacterias). Como estas transformaron el agua para obtener el hidrógeno necesario para llevar a cabo las reducciones metabólicas, esta bacteria arrojó toneladas de O₂ a la atmósfera. El aumento inexorable en la concentración de O₂ atmosférico fue ventajoso de alguna manera, eso llevó a la formación de ozono (O₃) a la capa de la estratosfera. La habilidad del O₃ y O₂ de filtrar la intensa radiación solar ultravioleta ayudó a los organismos a dejar el mar y colonizar la tierra.²¹

En la tabla 6.1 se muestra una cronología sobre las transformaciones químicas que dieron origen a los animales actuales.

Tabla 6.1 Algunos de los eventos que procedieron en la aparición de humanos en la tierra. ²¹

Tiempo aproximado (millones de años atrás)	Evento
3500	La radiación intensa solar bombardeó la superficie de la Tierra. La química de los radicales libres contribuyó a la formación de las primeras moléculas orgánicas complejas. Comenzó la vida anaeróbica, formación de productos tales como sulfito, nitrito y alcohol.
>2500	Las algas verde-azules (cianobacterias) adquieren la habilidad de descomponer el agua y liberar O ₂ : (2H ₂ O → 4H + O ₂ ↑)
1300	Los niveles de oxígeno en la atmósfera alcanzan el 1%. Los organismos anaerobios primitivo desaparecen o se retiran de áreas que contiene oxígeno. Células más complejas con núcleo (eucariontes) comienzan a evolucionar. Los eucariontes y procariontes son capaces de reducir O ₂ en agua.
500	Los niveles atmosféricos de oxígeno alcanzan un 10%. La capa de ozono protege de la luz UV y facilita la salida de los organismos del mar.
65	Aparecen los primates.
5	Los humanos aparecen. Los niveles atmosféricos de oxígeno son del 21%.

Los primeros organismos que vivían en la tierra lo hacían bajo una atmósfera que contenía una baja cantidad de O₂, ya que ellos eran esencialmente anaerobios. Hoy en día estos microorganismos anaerobios aun sobreviven, pero su crecimiento es inhibido y con frecuencia pueden morir al ser expuestos a una concentración de 21% de O₂, que son los niveles atmosféricos. Al incrementarse los niveles de O₂ muchos organismos primitivos murieron. Actualmente los microorganismos aerobios son probablemente descendientes de estos organismos primitivos que evolucionaron para adaptarse a los aumentos de los niveles de O₂ atmosféricos. Los organismos que toleraron la presencia de O₂, incluso evolucionaron para usar éste en transformaciones metabólicas (oxidasa, oxigenasa y sintasa, como oxido nítrico sintasa [NOS], citocromo P450) y para una producción eficiente de energía mediante reacciones tales como los que se llevan a cabo en la mitocondria. ²²

Los organismos aerobios han desarrollado defensas antioxidantes para protegerse en contra del 21% de O₂ pero no para niveles más altos que éste. De ahí que todos los aerobios sufren efectos nocivos si son expuestos a concentraciones más altas. Los efectos toxicológicos con oxígeno han sido descritos y observados desde hace tiempo.²² Louis Pasteur (1861, 1863) descubrió que el oxígeno puede ser letal para algunos microorganismos y propuso una distinción entre aerobios y anaerobios. Después Paul Bert (1871, 1878) retomó lo observado por Pasteur y demostró que el oxígeno puede incluso ser letal en organismos aerobios si se encuentra en concentraciones más elevadas que lo normal. Estos descubrimientos fueron desafortunadamente ignorados hasta 1940 y 1954 cuando sucedió el incidente de fibroplasia retrolental (formación de fibrios musculares detrás del cristalino) entre infantes recién nacidos que después sufrían ceguera.²³ No fue sino hasta 1945 que se asoció la fibroplasia retrolental con el uso de concentraciones elevadas de O₂ en incubadoras para recién nacidos. Hubo más cuidado en el control de las concentraciones de O₂ y administración del antioxidante α -tocoferol para disminuir los efectos. Sin embargo el problema no desapareció porque muchos infantes necesitaban aquellos niveles altos de O₂ para sobrevivir. En 1954, Gerschman propuso que los efectos dañinos de O₂ podrían ser atribuidos a la formación de radicales de oxígeno. Esta hipótesis fue popularizada y convertida en “la teoría del superóxido en la toxicidad por O₂”. Después fue estudiada la enzima superóxido dismutasa (SOD) por McCord y Fridovich. Con estos estudios, la teoría demuestra que la toxicidad con O₂ resulta de la formación excesiva del radical superóxido (O₂^{•-}) y que la enzima SOD es una defensa antioxidante importante. Igualmente importante, son las enzimas que cooperan con la SOD, removiendo el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que ésta produce, debe haber un balance correcto de la actividad de SOD y el sistema que remueve el H₂O₂. Si no existe éste balance contribuye a diferentes patologías tales como la enfermedad de Parkinson, donde los niveles de SOD son elevados, pero no aquellas enzimas que eliminan H₂O₂ en la sustancia *nigra* y los niveles de glutatión (GSH) son bajos.²²

6.4.1 Radicales libres y oxidantes

Los radicales libres (RL) son fragmentos moleculares, capaces de existir independientemente, que tienen un electrón no apareado, casi siempre tienen una vida corta y son muy reactivos.⁴

Los RL tienen diferentes funciones en los sistemas biológicos tales como: promotores de especies ferrilo, reducción de ribonucleótidos, reacciones de oxidación, como oxidación de etanol por radicales libres, carboxilación e hidroxilación, fagocitosis, actividad de peroxidasa y NADH oxidasa, maduración y respuesta al daño en tejidos vegetales, etc. También tienen otras, tales como la regulación controlada de los mecanismos celulares normales y el control de reacciones enzimáticas (por ejemplo, citocromo P-450 y ciclo-oxigenasa) o bien, pueden ser productos de reacciones catalizadas enzimáticamente (tales como las catalizadas por la xantina oxidasa).²¹

En la tabla 6.2 se muestran algunos radicales libres presentes en los organismos vivos

Tabla 6.2 Ejemplo de radicales libres en los seres vivos ²²

NOMBRE	FORMULA	CARACTERISTICA
Átomo de hidrógeno	H [•]	El radical libre más simple
Triclorometil	[•] CCl ₃	Un radical centrado en el carbón es formado durante el metabolismo de CCl ₄ en el hígado y contribuye a los efectos tóxicos de este solvente. Este radical reacciona rápidamente con O ₂ para formar el radical peroxilo. $\text{•CCl}_3 + \text{O}_2 \longrightarrow \text{CCl}_3\text{O}_2^{\bullet}$
Superóxido	O ₂ ^{•-}	Un radical centrado en el oxígeno. Este radical se origina por la reducción a un electrón del O ₂
Hidroxilo	[•] OH	Un radical centrado en el oxígeno es altamente reactivo.
Tiilo	RS [•]	Un grupo de radicales con un electrón no apareado centrado en el azufre, puede combinarse con O ₂ y formar peroxil tiilo (RSO ₂ [•]) y otro radical oxisulfurados.
Óxidos de nitrógeno	NO [•] , NO ₂ [•]	El óxido nítrico se forma <i>in vivo</i> desde el aminoácido L-arginina. El dióxido de nitrógeno se forma cuando el NO reacciona con el O ₂ . El NO [•] y NO ₂ [•] se encuentran en el aire, humo de cigarro, y humo proveniente del calentamiento de materiales orgánicos.

La actividad química de los radicales libres varía y algunos se usan en el metabolismo. Bajo niveles fisiológicos normales, algunos oxidantes tienen funciones esenciales en los sistemas biológicos. El primer ejemplo es el óxido nítrico (monóxido de nitrógeno, NO[•]) sintetizado *in vivo* del aminoácido L-arginina por enzimas NOS en células vasculares endoteliales, fagocitos, neuronas y muchos otros tipos de células. El óxido nítrico es un vasodilatador y un agente antitrombótico, un neurotransmisor y un regulador de secreciones y muchas otras actividades. También se ha encontrado que funciona como un neurotransmisor en el sistema nervioso central en partes del cerebro que son asociadas con la memoria. El óxido nítrico está involucrado en la muerte de parásitos por macrófagos en algunas especies mamíferas. Sin embargo, excesivos

niveles fisiológicos de NO[•] puede ser tóxico. En efecto una sobreproducción de NO[•] contribuye en la generación de enfermedades inflamatorias.²²

El radical superóxido (O₂^{•-}) se produce *in vivo* por células fagocíticas (neutrófilos, monolitos, eosinófilos) y ayuda a inactivar virus, hongos y bacterias. Neutrófilos activados también genera ácido hipocloroso, HClOI, un oxidante poderoso y agente clorante.

6.4.2 Especies reactivas de oxígeno

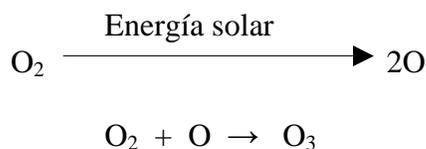
Las especies reactivas de oxígeno (ROS) es un término colectivo que involucra no sólo a los RL derivados de oxígeno, sino también a los no radicales derivados de la reducción molecular de oxígeno, tales como: el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) el cual no contiene electrones desapareados, es el principal precursor del radical hidroxilo; ácido hipocloroso (HClO), radicales alcoxilos (RO[•]) o peroxilos (RO₂[•]), entre otros. En la tabla 6.3 se muestran los ROS más importantes.²⁴

Tabla 6.3 Especies reactivas de oxígeno.²¹

Radicales	No-radicales
Superóxido, O ₂ ^{•-}	Peroxido de hidrógeno H ₂ O ₂
Hidroxilo, OH [•]	Ácido hipocloroso HClO
Peroxilo, RO [•]	Ozono O ₃
	Peroxinitrilo ⁻ OONO

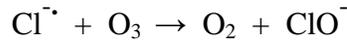
6.4.3 Ozono (O₃)

El ozono (O₃) es un escudo importante en la radiación solar en las partes altas de la atmósfera. El ozono se produce por la fotodisociación del O₂ en átomos de oxígeno, los cuales posteriormente reaccionan con las moléculas de O₂:



El ozono tiene un olor picante irritante y provoca daño severo a los pulmones. Este es un agente oxidante mucho más fuerte que el oxígeno que se tiene en la tierra. Cantidades significantes de ozono se pueden formar en la parte más baja de la atmósfera, en el aire urbano, como un resultado de una serie de eventos fotoquímicos complejos generados por la contaminación ambiental.

La toxicidad por O₃ aparece debida a oxidaciones directas por O₃, aunque también los radicales libres pueden ser involucrados. Recientemente ha habido preocupación por el uso de hidrocarburos fluorados, por ejemplo, aerosoles porque ellos pueden ayudar a reducir la capa de ozono en la atmósfera superior. La fotodisociación homolítica de los gases de clorofluorocarbonos, tales como CF₂Cl₂ y CFC₃ producen radicales cloro en la atmósfera, los cuales reaccionan con ozono:²¹



6.4.4 Daño oxidativo (estrés oxidativo)

Los oxidantes y los antioxidantes interactúan entre si dentro de los organismos vivos. Sin embargo, cuando el nivel de oxidantes es mayor que los antioxidantes, el resultado es “estrés oxidativo” y habrá daño en los sistemas biológicos. Figura 6.3 y 6.4.²⁵

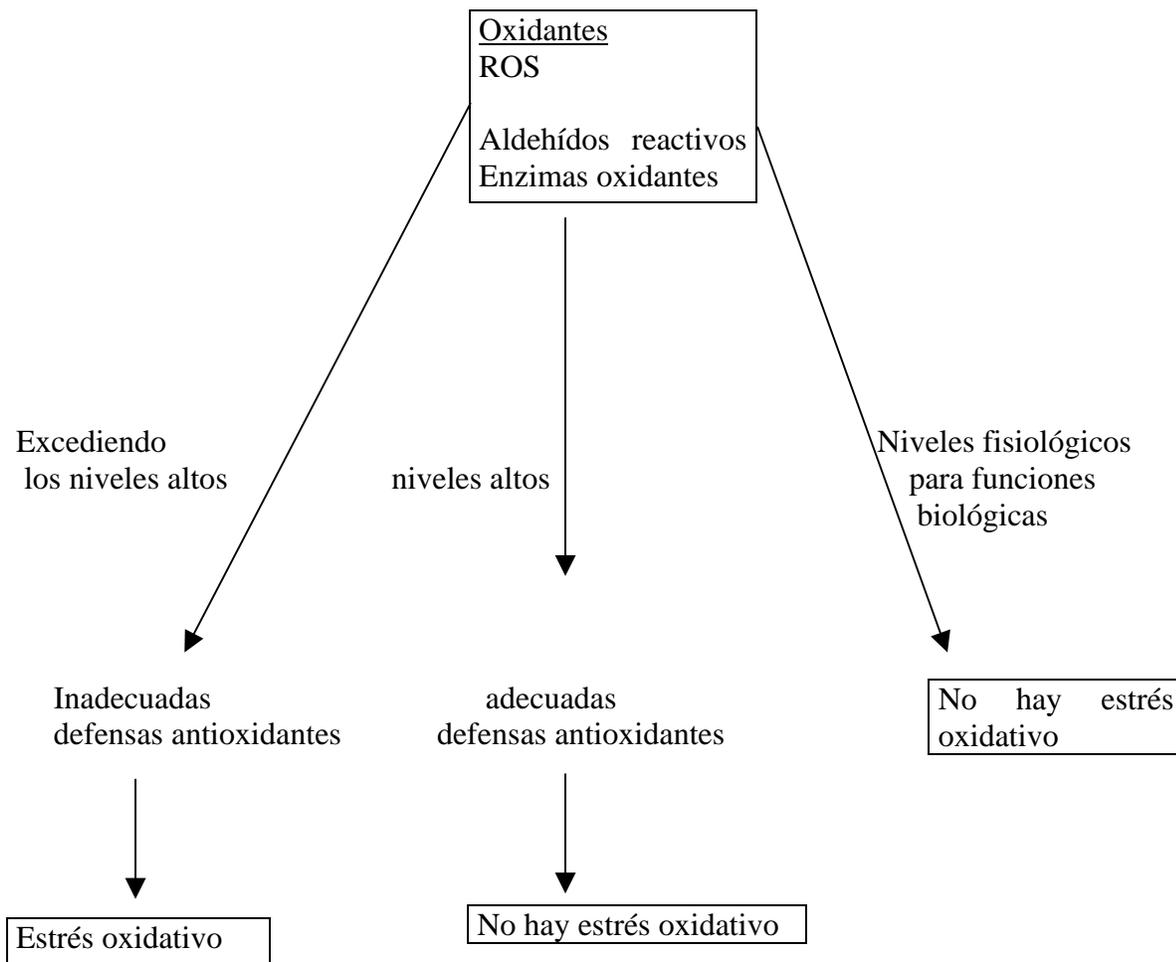


Figura 6.3 Condiciones para la presencia de estrés oxidativo.²²

El estrés oxidativo puede afectar tanto a pequeñas como a grandes biomoléculas en el cuerpo humano. Estos oxidantes pueden afectar la estructura y funcionamiento de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, los cuales eventualmente causan daño a la célula y posteriormente su muerte.

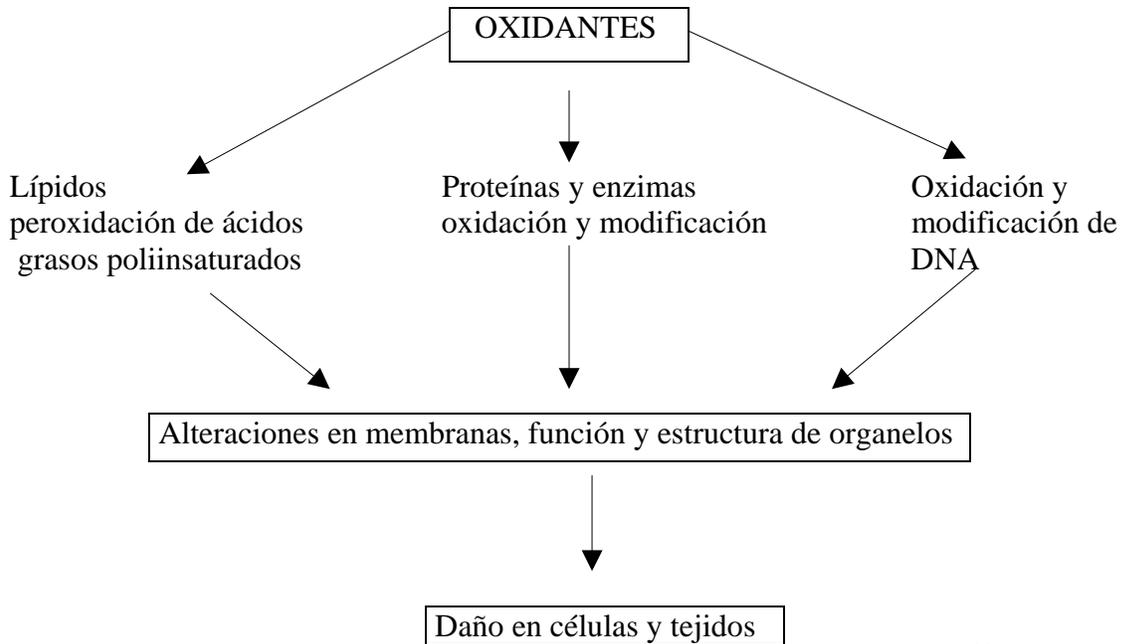


Figura 6.4 Influencia de oxidantes en biomoléculas de sistemas biológicos ²²

El estrés oxidativo se define como una perturbación en el equilibrio del oxidantes-antioxidantes. ²⁵

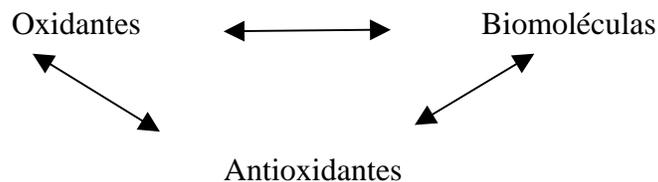


Figura 6.5 Interacción entre oxidantes, antioxidantes y biomoléculas

El estrés oxidativo puede ser el resultado de lo siguiente eventos:

1. Disminución de antioxidantes endógeno, o una falta de antioxidantes en la dieta causados por una mala nutrición. Las dietas deben contener hierro, cobre, manganeso, riboflavina ya que son importantes para la elaboración de GSH.
2. Producción excesiva de ROS por exposición a elevadas concentraciones de O₂, la presencia de toxinas que son metabolizadas y producen radicales libres, o una activación excesiva del sistema que produce radicales.

Las consecuencias biológicas de la deficiencia de la vitamina E, deficiencia de selenio, y una exposición excesiva de radiación pueden ser el resultado de un daño oxidativo, el daño oxidativo puede contribuir a desencadenar arterosclerosis, cáncer, inflamación crónica, enfermedades neurodegenerativas, entre otras. En la tabla 4.4 se muestran algunas enfermedades originadas por los ROS y RNS.

Tabla 6.4 Algunas de las condiciones clínicas en las cuales están involucradas ROS/RNS. ²¹

La lesión inmune inflamatoria
Glomerulonefritis
Artritis reumatoide
Hepatitis
Glóbulos rojos:
Malaria
Favismo
Pulmón:
Efisema
Asma
Fibrosis cística
Sistema cardiovascular;
Arteriosclerosis
Enfermedad Keshan (deficiencia de selenio)
Sistema nerviosos:
Enfermedad de Alzheimer
Enfermedad de Parkinson
Encefalomiелitis

Se ha visto que el estrés oxidativo contribuye más en inflamaciones crónicas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas.

6.4.5 Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que en concentraciones bajas comparadas al sustrato oxidable, significativamente tarda o previene la oxidación de este sustrato.

El término sustrato oxidable incluye cualquier cosa que se encuentra en las células: proteínas, carbohidratos y DNA.²¹

Las defensas antioxidantes constan de:

- a) Agentes que catalíticamente eliminan los radicales libres y otras especies reactivas; como ejemplo están las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa y antioxidantes que contienen el grupo funcional tiol.
- b) Proteínas que protegen a las biomoléculas contra ciertos daños (incluyendo daño oxidativo).
- c) Agentes de bajo peso molecular que eliminan ROS. Como ejemplo se tiene al glutatión, α -tocoferol y posiblemente bilirrubina y ácido úrico. Algunos antioxidantes provienen de la dieta, especialmente ácido ascórbico y α -tocoferol.

Las defensas antioxidantes de los organismos pueden con frecuencia ser inducidas por la exposición a ROS. En años recientes, científicos han encontrado que las defensas antioxidantes no son suficientes (ellos no pueden prevenir el daño completamente), ya que el daño oxidativo al DNA, proteínas, lípidos y moléculas pequeñas puede ser demostrado bajo un ambiente de O₂. De esta forma el O₂ al 21% es tóxico.²¹

Mecanismos de acción de antioxidantes:

Minimizan los niveles de O₂

Recogen las especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y cloro.

Inhiben la formación de ROS, o sus precursores.

6.4.5.1 Defensas antioxidantes en el cuerpo humano

Todos los organismos sufren exposición a $\cdot\text{OH}$, este radical es muy reactivo con todas las moléculas biológicas. Una vez que el $\cdot\text{OH}$ ha sido formado, el daño causado por este radical es inevitable y se comienza a llevar a cabo un proceso de reparación. Así la reparación puede considerarse como un mecanismo de defensa de antioxidante.

Tabla 6.5 Reparación del daño oxidativo²²

Sustrato en donde hay daño	Sistema reparador
<p>DNA</p> <p>Todos los componentes de DNA pueden ser atacados por $\cdot\text{OH}$, considerando que O_2 ataca preferentemente a guanina. H_2O_2, $\text{NO}\cdot$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ no atacan al DNA.</p>	<p>Una gran cantidad de enzimas que existen en el organismo reconocen anomalías en el DNA y los remueve por extirpación, resíntesis y volverse a unir a la cadena de DNA</p>
<p>Proteínas</p> <p>El radical hidroxilo ataca a muchos residuos de aminoácidos. Las proteínas con frecuencia unen iones de metales de transición, haciendo a estos como un blanco de ataque "sitio específico" de $\text{OH}\cdot$.</p>	<p>Los residuos de metionina oxidada pueden ser reparados por la metionina sulfóxido reductasa. El daño de las proteínas puede ser reparado y preferentemente destruido por las proteasas.</p>
<p>Lípidos</p> <p>Algunos ROS (no incluye $\text{NO}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ o H_2O_2) pueden iniciar la peroxidación de lípidos para generar productos citotóxicos incluyendo aldehídos.</p>	<p>Los antioxidantes (especialmente α-tocoferol) remueve las cadenas de los radicales peroxil propagados. La enzima glutatión hidroperóxido fosfolípido peroxidasa puede remover peróxidos de las membranas.</p>

Los antioxidantes incluyen enzimas que son piedra angular en los sistemas protectores y evitan el incremento excesivo de especies oxidables indeseables y estas son: el superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) y también las vitaminas que protegen a los tejidos de los efectos que pueden causar las especies reactivas de oxígeno y los radicales libres.²²

Estas enzimas tienen diversas funciones tales como:

SOD, la cual acelera la dismutación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 .

Catalasa y glutatión peroxidasa, las cuales descomponen H_2O_2 en agua.

Flavonoides, carotenoides y ubiquinol, enzimas involucradas en la regeneración de formas oxidadas de pequeñas moléculas antioxidantes.²⁶

6.4.5.2 Defensas antioxidantes exógenas

Se obtienen antioxidantes a partir de la dieta. El papel fisiológico de algunos de estos antioxidantes están bien establecidos (especialmente vitamina E) pero otros aún son inciertos. Esta es una importante área de investigación porque existe una buena evidencia de que los antioxidantes endógenos no previenen completamente el daño provocado por ROS en el cuerpo humano. La presencia de varios marcadores biológicos de daño oxidativo indican que el sistema reparador no siempre es 100% efectivo. Este daño oxidativo contribuye a daños cardiovasculares, cáncer y recientemente daño neurodegenerativo.²²

Otro aspecto de defensas antioxidantes está relacionado con algunas vitaminas y micro nutrientes antioxidantes que se tienen en la dieta, tabla 6.6. Un tipo de antioxidante son los carotenoides, ya que estudios recientes han mostrado que es un anticancerígeno. De esta manera los vegetales son de gran interés en este aspecto, ya que contienen carotenoides y este tiene un papel esencial en las reacciones de la foto-oxidación. Pero no hay que olvidar que las plantas contienen agentes carcinogénicos y pesticidas.²⁵

Tabla 6.6 Antioxidantes de la dieta²²

ANTIOXIDANTES	ESTADO
Vitamina E	Antioxidante esencial en humanos, protege de enfermedades cardiovasculares . Deficiencia severa causa neurodegeneración y arteriosclerosis acelerada
Vitamina C	Tiene múltiples papeles metabólicos, acción antioxidante, puede Eliminar muchos ROS/RNS/RCS.
β - caroteno, otros carotenoides, relacionados con los pigmentos de plantas	Evidencias epidemiológicas muestran que en niveles altos están asociados con disminuir el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares y cáncer principalmente en personas fumadoras. Carotenoides son buenos eliminadores de radicales libres.
Flavonoides, otros fenoles de plantas	Muchos fenoles de plantas inhiben la peroxidación de lípidos y la enzima lipoxigenasa.

Una dieta rica en frutas, nueces, granos y vegetales protegen al cuerpo humano de diversas enfermedades.²²

La industria alimenticia y la tecnología abarcan el uso de antioxidantes. El metabolismo de algunos de los antioxidantes fenólicos generan especies reactivas dañinas, así que actualmente hay un interés en la búsqueda del empleo de antioxidantes naturales en los procesos alimenticios, para preservar alimentos o colorantes.

Numerosos farmacólogos y químicos han investigado y desarrollado compuestos que ejercen efectos antioxidantes, con la esperanza de controlar el estrés oxidativo y las numerosas enfermedades que desencadena.²⁵

6.4.6 Peroxidación de lípidos²¹

La peroxidación de lípidos ha sido definida por A.L Tappel como el deterioro oxidativo de lípidos poliinsaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son los que tienen dos o más carbonos con dobles ligaduras $C = C$.

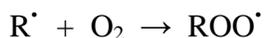
El deterioro dependiente de oxígeno, que lleva a la rancidez, ha sido reconocido desde la antigüedad como un problema en el almacenamiento de grasas y aceites y eran con frecuencia repartidas para ser usadas como especias. La rancidez es aún más relevante hoy en día con la popularidad de las margarinas poliinsaturadas y aceites para cocinar, y la importancia de pinturas, lacas, ceras y caucho, los cuales pueden sufrir daño oxidativo.

El primer intento para estudiar este problema fue en 1892 cuando Saussure uso un simple manómetro de mercurio, observó que la capa de la nuez en agua expuesta al aire absorbió tres veces su propio volumen de aire en el curso de 8 meses. Este periodo inicial largo fue seguido por una segunda fase de absorción rápida de aire, el aceite toma 60 veces su propio volumen de aire en 10 días. Durante 3 meses, la proporción de captación de aire disminuyó gradualmente, así que el aceite había subido en 145 minutos su propio volumen. Paralelo con estos cambios, se volvió viscoso y mal oliente. Haciendo un comentario sobre estos experimentos unos años después el famoso químico Berzelius sugiere que la captación de O_2 no solo puede considerarse por la autooxidación del aceite expuesto al aire, sino también por otro fenómeno similar. Berzelius también descubrió que el selenio ayuda a proteger contra la peroxidación de lípidos *in vivo*.

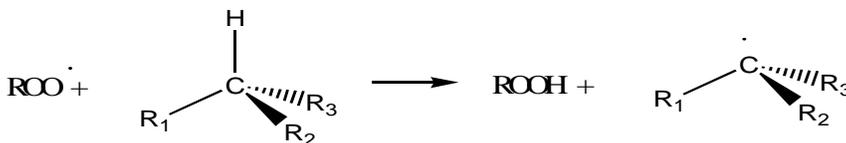
Esta secuencia de reacciones las cuales ahora son reconocidas como peroxidación lipídica fueron trabajadas en detalle por científicos de “British Rubber Producers” en 1940.²¹

La peroxidación de lípidos en una membrana o ácidos grasos poliinsaturados es causada por el ataque de una especie suficientemente reactiva para extraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno ($-CH_2-$). Entonces, cuando el átomo de hidrógeno toma su electrón del enlace, deja un electrón desapareado en el carbón $- \dot{C}H-$. Los ácidos grasos de un doble enlaces son más resistentes al ataque que los PUFAs.

La presencia de un doble enlace en los ácidos grasos debilita el enlace C-H sobre el átomo de carbono adyacente al doble enlace (posición alílica) y por tanto se puede eliminar fácilmente un H[•]. El radical carbono tiende a estabilizarse por medio de otra estructura resonante para producir un dieno conjugado, el cual reacciona con una molécula de oxígeno para formar un radical peróxido (R-OO[•]).²¹



Los radicales peróxido pueden abstraer un átomo de hidrógeno de otra molécula lipídica siendo ésta la etapa de propagación de la lipoperoxidación, y por tanto, una vez que el proceso ha iniciado, éste continúa; es decir es una reacción en cadena. El radical peróxido se combina con el átomo de hidrógeno para dar un hidroxiperóxido lipídico R-COOH.



Este es el estado de propagación de la lipoperoxidación. El radical formado en el carbón puede reaccionar con O₂ para formar otro radical peroxilo y la peroxidación lipídica continua, figura 6.6.²¹

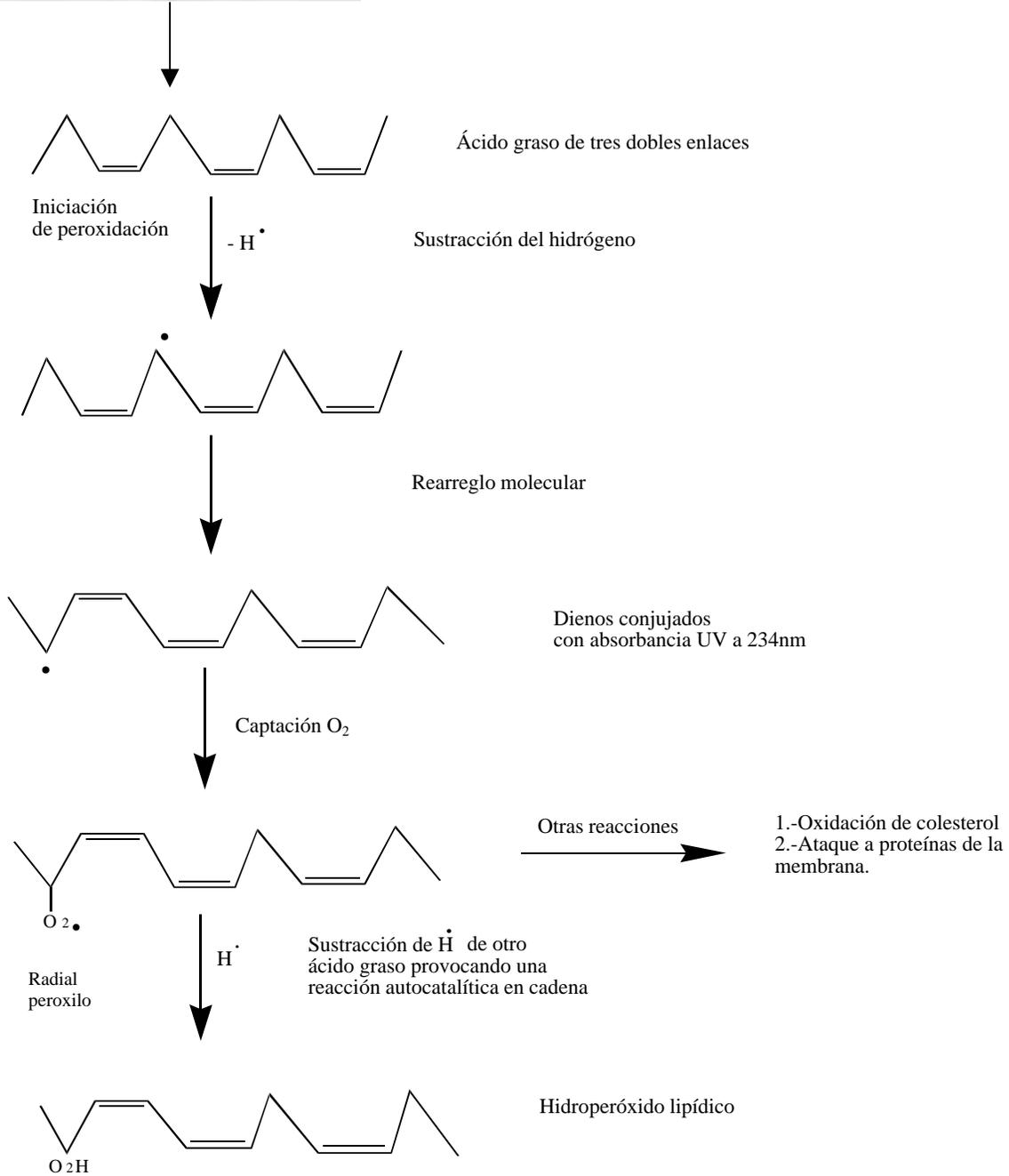


Figura 6.6 Mecanismo propuesto para la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica. ²¹

Una alternativa del radical peróxilo es que forme peróxidos cíclicos, figura 6.7.

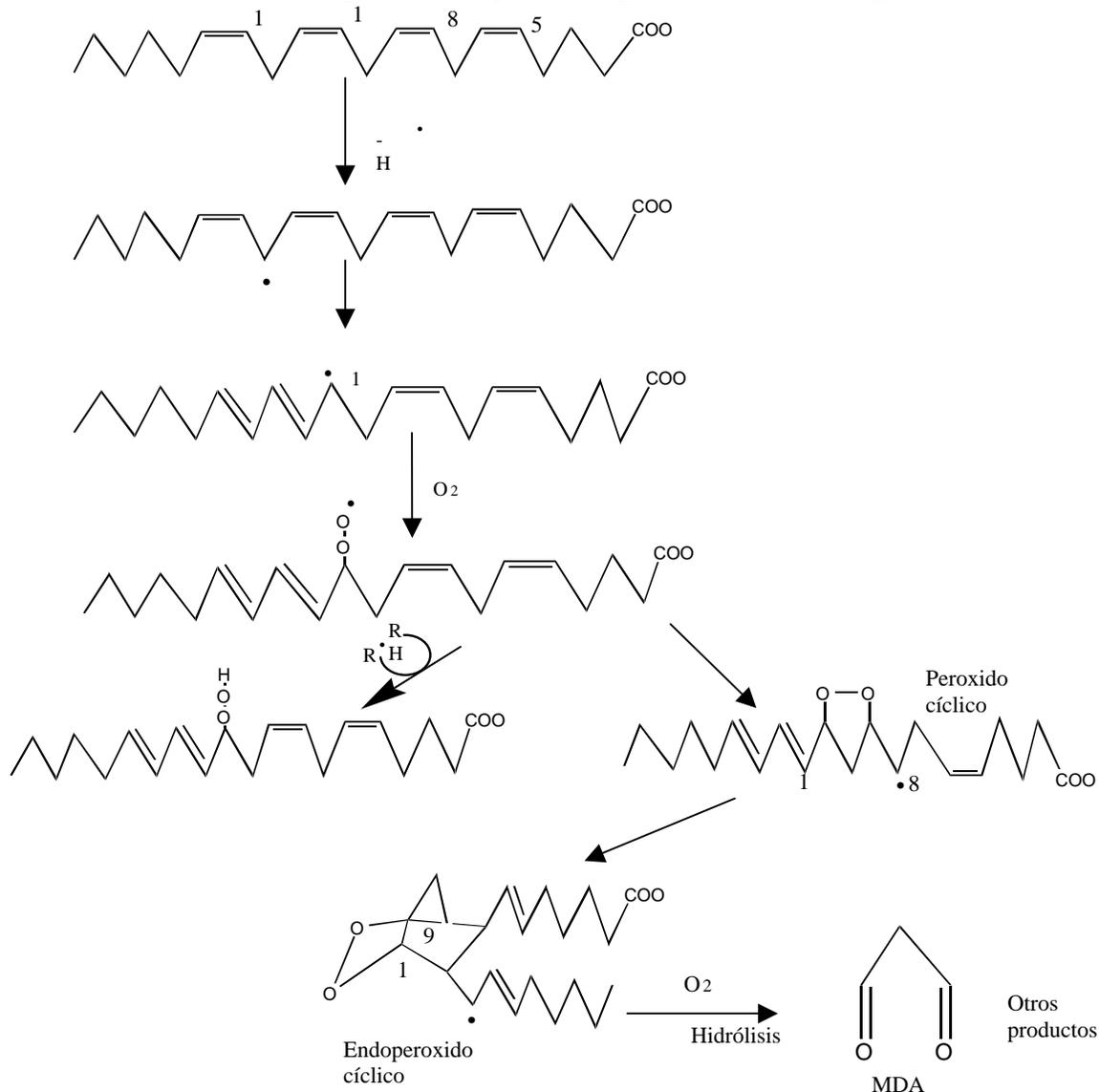


Figura 6.7 Mecanismo propuesto para la formación de peróxidos cíclicos a partir de ácido araquínico. ²¹

Un punto esencial de la lipoperoxidación es que los ácidos grasos no saturados, al ser degradados por este mecanismo conducen de manera directa o indirecta, a la obtención de malondialdehído (MDA) como producto final, el cual es extremadamente reactivo generando bases de Schiff, las cuales se pueden identificar por fluorescencia. La lipoperoxidación aumenta la rigidez de la membrana dando como resultado la disminución de enzimas y de receptores hormonales, provocando una alteración en las propiedades fisiológicas tales como fluidez, permeabilidad y transporte.

La descomposición de peróxidos de lípidos por calor a alta temperatura genera productos, tales como, epóxidos, aldehídos saturados, aldehídos insaturados, cetonas e hidrocarburos. ²¹

6.4.7 Glutación peroxidasa

El glutación está entre los más importantes antioxidantes en la célula, usándose en reacciones enzimáticas para eliminar peróxidos y reacciones no enzimáticas para mantener ascorbato y α -tocoferol en su forma funcional y reducida. En estas reacciones el glutación reducido (GSH) se convierte en su forma disulfuro, GSSG. La mayoría del GSSG formado (entre el 95 y el 99%) es inmediatamente reducido a GSH a través del glutación reductasa con el cofactor NADPH figura 6.9.

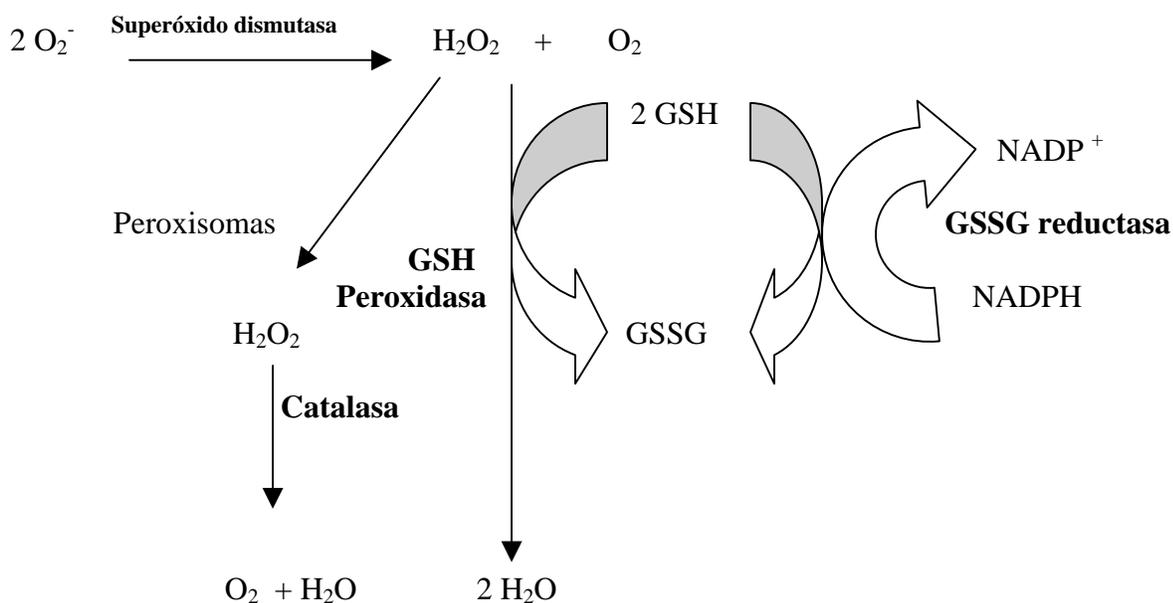


Figura 6.9 Mecanismo de defensa enzimática ²¹

El GSSG y la suma de GSH se determinan con un ensayo modificado originalmente descrito por Títese. GSSG es reducido enzimáticamente con NADPH a GSH que entonces reduce al ácido 5,5'-ditiobis(2nitrobenzoico) espontáneamente a 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB). La formación de TNB dentro de un tiempo dado se determina a 412nm. La reacción también es influenciada por la actividad de la glutación reductasa y otros factores, tales como la fuerza iónica del buffer y químicos presentes en la perfusión. ²¹

6.4.8 Aumento del daño oxidativo con envejecimiento

Se ha encontrado que la carga de biomoléculas oxidadas aumenta con la edad en una variedad de especies, incluyendo humanos. Un grupo de investigadores mostraron que la edad esta relacionada con los aumentos del daño oxidativo en el DNA y proteínas los cuales han sido observados en varios tejidos de células, así como en cerebro y ojo del humano.

Las funciones del SOD, CAT y GPx son de destoxificar los organismos de ROS y proporcionar protección de daño oxidativo. También los RL pueden ser directamente eliminados por antioxidantes moleculares de bajo peso molecular, principalmente glutatión, ascorbato y vitamina E. Los niveles de SOD, GPx, ascorbato, vitamina E, y GSH disminuyen con la edad, acompañado por una elevación simultanea en la peroxidación de lípidos. Otros estudios han reportado una disminución similar de las defensas antioxidantes en pacientes mayores y en animales viejos. Sin embargo, la importancia de estos hallazgos no es muy significativa debido a la falta de uniformidad relacionada con la edad y el status antioxidante.²⁶

6.4.9 El cerebro propenso a estrés oxidativo

Se ha dicho a menudo que el cerebro y el tejido nervioso están propensos a un daño oxidativo por diversas razones:

- 1.- La presencia de aminoácidos. Se ha sugerido que el estrés oxidativo pueda promover la liberación de aminoácidos, generando un “circulo vicioso” de eventos. Otro evento relevante es la habilidad de varios ROS para inactivar la enzima glutamina sintetasa.
- 2.- La membrana de las neuronas contienen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, por tanto hay más probabilidad de llevar a cabo peroxidación de lípidos.
- 3.-El metabolismo del cerebro genera H_2O_2 .
- 4.-Las defensas antioxidantes son modestas. En particular, los niveles de catalasa son bajas en la mayoría de las regiones de los cerebros.
- 5.-El citocromo P450 está presente en ciertas regiones del cerebro.²¹

6.4.9.1 Consecuencias del estrés oxidativo

Como en otros tejidos, el estrés oxidativo puede causar daño a las neuronas por varios mecanismos.

- a) Aumenta la peroxidación de lípidos. Por ejemplo, el aldehído *HNE* es un neurotóxico y puede causar constricción de arteriolas cerebrales.
- b) El daño oxidativo al DNA, causa modificación en las bases.
- c) Daño a proteínas.
- d) Inducción a necrosis y apoptosis.²¹

6.4.9.2 Daño neurodegenerativo

La importancia de los radicales libres en la neurodegeneración se está incrementando en forma evidente. De hecho, los radicales libres están asociados con algunos desordenes del cerebro. Está claro que los radicales libres están involucrados en la psicología normal del cerebro.

Los radicales libres se forman durante el metabolismo normal. Esto es especialmente evidente en el tejido nervioso en el que hay una densidad mitocondrial alta y una actividad metabólica también alta. Las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos son los que sufren daño por los radicales libres, el daño puede ser especialmente contundente si el blanco es la mitocondria que después produce más radicales libres, creando un ciclo vicioso. Un radical el cual asume una importante posición en la fisiología y patofisiología en el cerebro es el óxido nítrico (NO). Tiene varios papeles como una molécula mensajera en la función de la neurona pero el exceso de éste puede ser citotóxico.²⁸

Además, el papel de los radicales libres está involucrado en una variedad de desórdenes cerebrales. En epilepsia, la enzima superóxido dismutasa en cantidades anormales juega un papel importante. En la enfermedad de Alzheimer también están involucrados los radicales libres, como se evidencia por modificación oxidativa de proteínas y la agregación de β -amiloide. En la enfermedad de Alzheimer así como en el envejecimiento, los niveles de superóxido dismutasa son anormales. Los procesos de los radicales libres están involucrados con el estrés y desordenes mentales, como se evidencia por la peroxidación de lípidos.

Los radicales libres están involucrados en muchos desórdenes cerebrales, por lo que se abre la posibilidad de una prevención o terapia mediante el uso de antioxidantes. Nuevos neuroprotectores actualmente son útiles para el uso en la terapéutica del cerebro. Entre éstos están los antioxidantes ácidos α -lipoicos y reactivos que atrapan radicales que han demostrado protección contra lesiones cerebrales en modelos de isquemia focal e isquemia-reperfusion.²⁸

6.4.10 Aprendizaje en ratas. ²⁹

Bajo el tema de aprendizaje, hay una constante preocupación por el proceso por medio del cual un animal se ajusta a nuevas situaciones, situaciones en las cuales su repertorio previo de hábitat no es el adecuado. El aprendizaje se define como la modificación de las capacidades del animal como resultado de la actividad conductual.

En el análisis del proceso por medio del cual un animal aprende a ajustarse a nuevas situaciones, se ha encontrado útil para delimitar dos fases separadas: (1) la fase de ajuste inicial o realización; y (2) la fase de fijación o estabilización. Así, cuando un animal se pone en una nueva situación, y se impele por un paseo interior de alguna clase de actividad persistente en la dirección de una meta particular, el primer estado de aprendizaje puede considerarse como completado cuando el animal tiene éxito al alcanzar el incentivo.

Ahora bien si el animal se pone nuevamente en la situación inicial, y el mismo paseo es operativo, comienza un nuevo proceso de ajuste, el cual puede acabar de nuevo con el alcance del incentivo. En pruebas sucesivas de esta clase, la conducta exhibida por el animal en el alcance del incentivo es frecuentemente modificado de tal manera que el animal puede finalmente lograr el incentivo de la manera más directa posible, sin los muchos actos innecesarios invariablemente observados en el ensayo inicial. La última serie de cambios en el proceso de ajuste involucra un proceso de reorganización y estabilización de la conducta del animal. Por conveniencia nosotros nos referimos a esto como un estado de fijación.

Se dice que durante esta segunda fase de aprendizaje, no hay ningún cambio en el modelo de conducta del animal en los ensayos sucesivos. Al contrario, es probable que la conducta exhiba un curso continuo de modificaciones y reorganización. ²⁹

Algunos tipos de situaciones de aprendizaje experimental han sido encontrados y adaptados para la investigación de ambos estados de aprendizaje, otros han sido encontrados para la investigación de uno u otro estado de aprendizaje.

Los métodos básicos usados para la investigación del aprendizaje en la rata pueden ser clasificados en términos del tipo de situación en la cual se coloca al animal y en la cual ocurre el aprendizaje. Cuatro métodos son convencionalmente diferenciados: (1) el método de respuesta condicionada; (2) el método de respuesta discriminatoria; (3) el método del laberinto; y (4) método problema.

En el método de la respuesta condicionada existen varias técnicas, una de ellas es la técnica que involucra el escape-respuesta del animal.

Esta técnica brinda una asociación entre el estímulo y la respuesta.

Investigadores han descrito técnicas para establecer las respuestas condicionadas en base a una respuesta de escape del animal mediante una parrilla cargada eléctricamente. El primer aparato de esta clase ha sido descrito por Warner, aunque no fue diseñado o representado como un aparato para establecer la respuesta condicionada. Este consistía en una caja con dos compartimentos separados con una división. El suelo de cada uno era una parrilla la cual podía

estar cargada eléctricamente. Cuando la parrilla en la cual el animal descansa esta cargada, la rata puede escapar saltando encima de la división hacia el otro compartimiento. O si la parrilla del segundo compartimiento esta cargada, el animal puede escapar saltado hacia atrás al compartimiento original. Si un estímulo dado, tal como el sonido de un zumbador, simplemente fue presentado antes de cargar la parrilla por una serie de ensayos, el animal se condicionó al estímulo, y respondería saltando al extremo opuesto de la caja antes de que recibiera el estímulo de la parrilla. ²⁹

7. DESARROLLO EXPERIMENTAL

7.1 Reactivos y disolventes

Los reactivos utilizados son de la marca Aldrich y se utilizaron sin previa purificación:

Ácido acético
Ácido clorhídrico
Ácido 5, 5' - ditiobis (2-nitrobenzoico)
Ácido metafosfórico glacial
Ácido tiobarbitúrico
Agua desionizada
Agua purificada marca Electropura
Butanol
Cloruro de potasio
Cloruro de sodio
EDTA
Fosfato dibásico de sodio
Glutación reducido
Malondialdehído
Peróxido de hidrógeno
Piridina
TRIS base

7.2 Equipo y aparatos

Balanza para pesar animales sin marca
Balanza analítica marca ESHER
Celda dividida de flujo continuo modelo SUELECTROSYNCELL obtenida de la compañía ELECTROCELL AB. Akersberga, Suecia.
Cámara para generar ozono marca PCI OZONE y CONTROL SYSTEMS INC.
Espectrofotómetro UV marca ESPECTRONIC.
Fuente de poder marca FIMESA modelo 301M Rect. 100 Ampers 30 Volts
pH-metro marca CONDUCTRONIC.
Potenciostato-galvanostato marca ROHODE AND SCHWARDZ
STROMVERSORUNGSGERAT DC-POWER, 0-30V, 0-20A
Vortex sin marca
Transformador de voltaje marca VOLTcraft.
Centrifuga marca LW SCIENTIFIC. INC.
Estimulador fotoeléctrico marca GRASS S88.

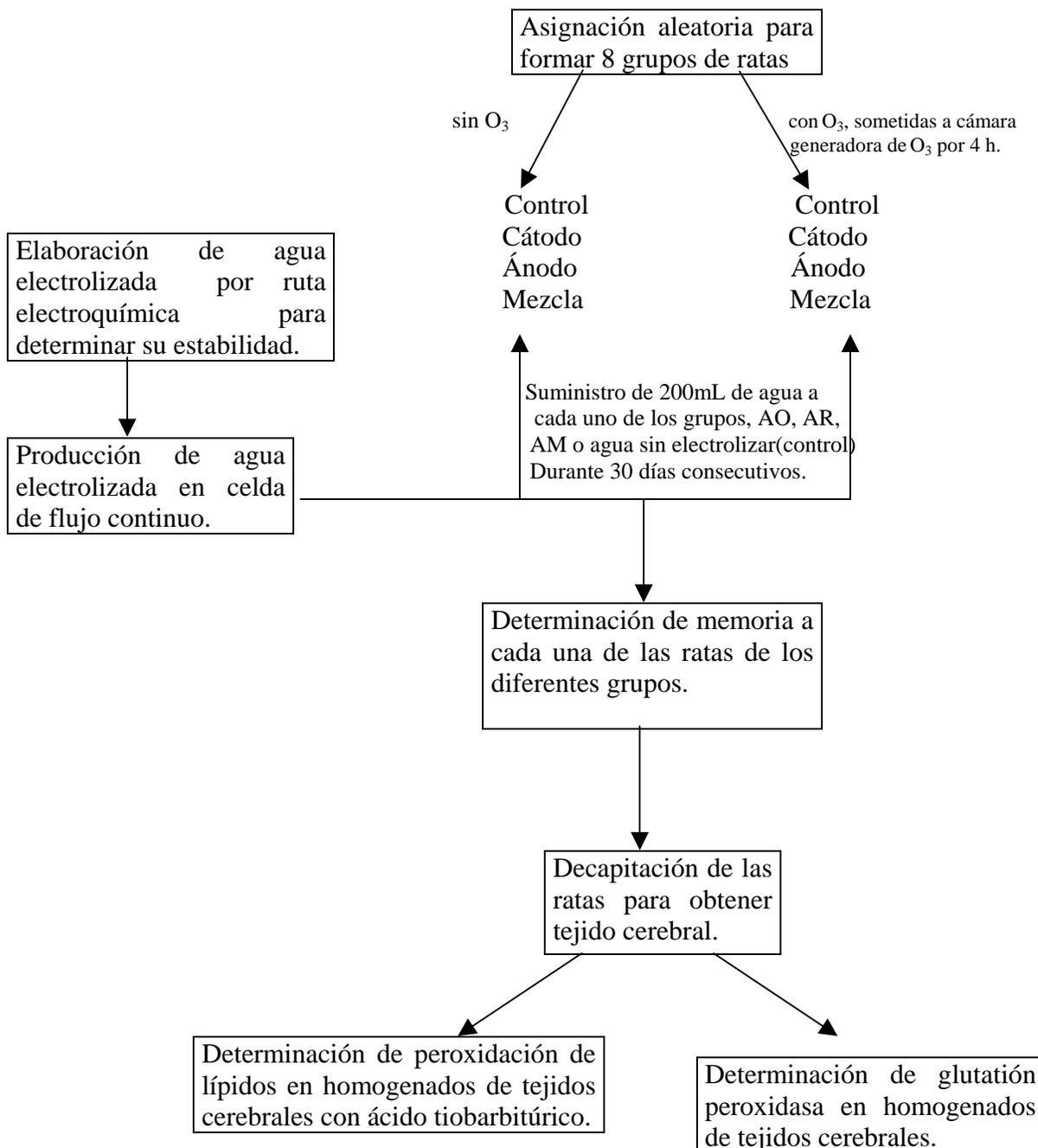
7.3 Material biológico

Ratas macho adulto de la cepa Wistar de 2 años 3 meses (300-500g).

7.4 Métodos

Mediante el siguiente diagrama de flujo se muestra el procedimiento general que se llevó a cabo para la realización del proyecto.

DIAGRAMA DE FLUJO



7.4.1 Estabilidad del agua

Para este experimento se utilizó una celda de flujo continuo cuyo diseño se muestra en la figura 7.1.

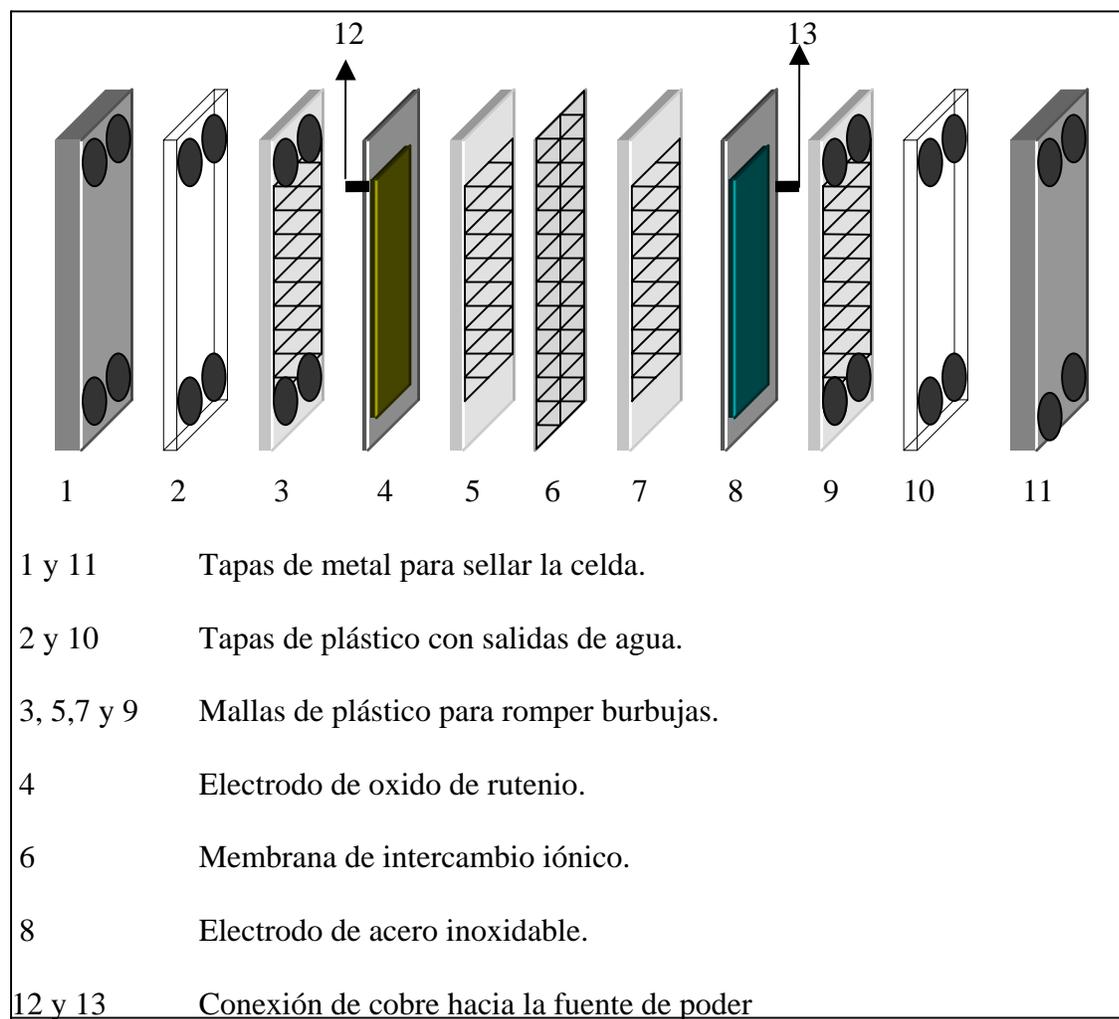


Figura 7.1 Diseño de celda electroquímica

A partir del suministro de agua purificada de la marca “Electropura” se llevó a cabo la producción de AR, AO Y AM haciéndola pasar por el sistema que se muestra en la figura 7.2.



Figura 7.2 Sistema de obtención de agua electrolizada

El suministro de agua para el compartimiento catódico se llevó a cabo por medio de una bomba y para el compartimiento anódico fue por gravedad a partir de un recipiente colocado en la parte superior de la celda.

Después de su obtención se procedió a medir el pH, potencial redox y conductividad tanto a éstas como al agua sin electrolizar en diferentes horas y días con el objeto de determinar la estabilidad de éstas. Esto se realizó con el objeto de encontrar el tiempo óptimo en el que se puede administrar el agua electrolizada sin que pierda sus propiedades fisicoquímicas.

7.4.2 Administración de agua electrolizada a ratas

Una vez determinada la estabilidad del agua electrolizada se procedió a la producción de ésta. Para ello se realizaron experimentos para encontrar las mejores condiciones de flujo y corriente y generara de esta manera el pH y potencial redox óptimos. Una vez obtenidos estos parámetros se generó AO, AR Y AM para administrárselas a las ratas.

Se utilizaron 57 ratas machos adultos de la cepa Wistar albinas. De este total de ratas se asignaron aleatoriamente para formar los 8 diferentes grupos, distribuidos de la siguiente manera:

Ratas sin ozono { Control (6 ratas)
Cátodo (7 ratas)
Ánodo (7 ratas)
Mezcla (7 ratas)

Ratas con ozono { Control (7 ratas)
Cátodo (8 ratas)
Ánodo (7 ratas)
Mezcla (8 ratas)

Para evitar confusiones y poder identificar a cada una de las ratas de los diferentes grupos se procedió a etiquetarlas desde un inicio con marcadores de diferentes colores en la base de la cola, dependiendo del tratamiento que se le fuera a dar, ya sea la administración de AR, AO, AM o agua sin electrolizar.

Muestras sin ozono

Agua control ●
Agua catódica ●
Agua anódica ●
Agua de mezcla ●

Las ratas sometidas a ozono fueron marcadas con los mismos colores sólo que en este caso se marcó con una raya azul para diferenciarlas de las ratas que no se les suministró ozono.

Las ratas con ozono eran colocadas diariamente por un lapso de 4 horas en una cámara que generaba ozono en una concentración de 0.250 ppm figura 7.3 y 7.4.



Figura 7.3 Generador de ozono



Figura 7.4 Equipo generador de ozono y cámaras con ozono

Las ratas fueron colocadas en sus respectivas jaulas etiquetadas, suministrándoles 200mL de agua a cada una de ellas, AO, AR, AM o agua sin electrolizar (control). Durante 30 días consecutivos se elaboró diariamente agua para que las ratas tuvieran agua fresca electrolizada.

Para tener un buen control de peso, al iniciar el experimento se pesaron a todas las ratas y posteriormente cada 8 días mientras duró el experimento.

Al final del tratamiento se realizó la prueba de memoria a cada una de las ratas de los diferentes grupos.

7.4.3 Prueba de memoria⁸

Se colocó a cada una de las ratas de cada grupo en un sistema para determinación de memoria figura 7.5.

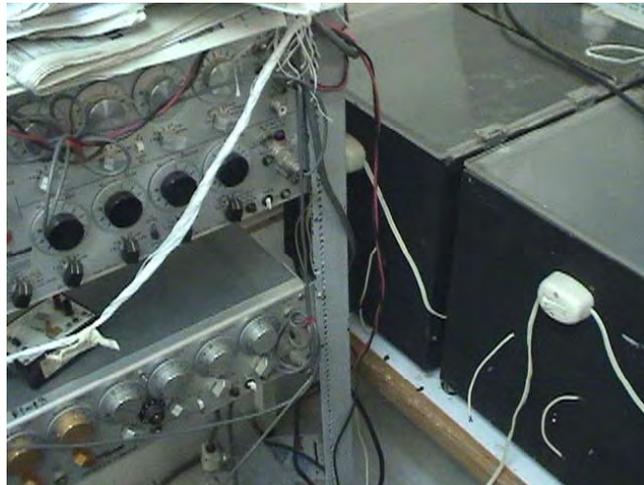


Figura 7.5 Aparato para realizar pruebas de memoria.

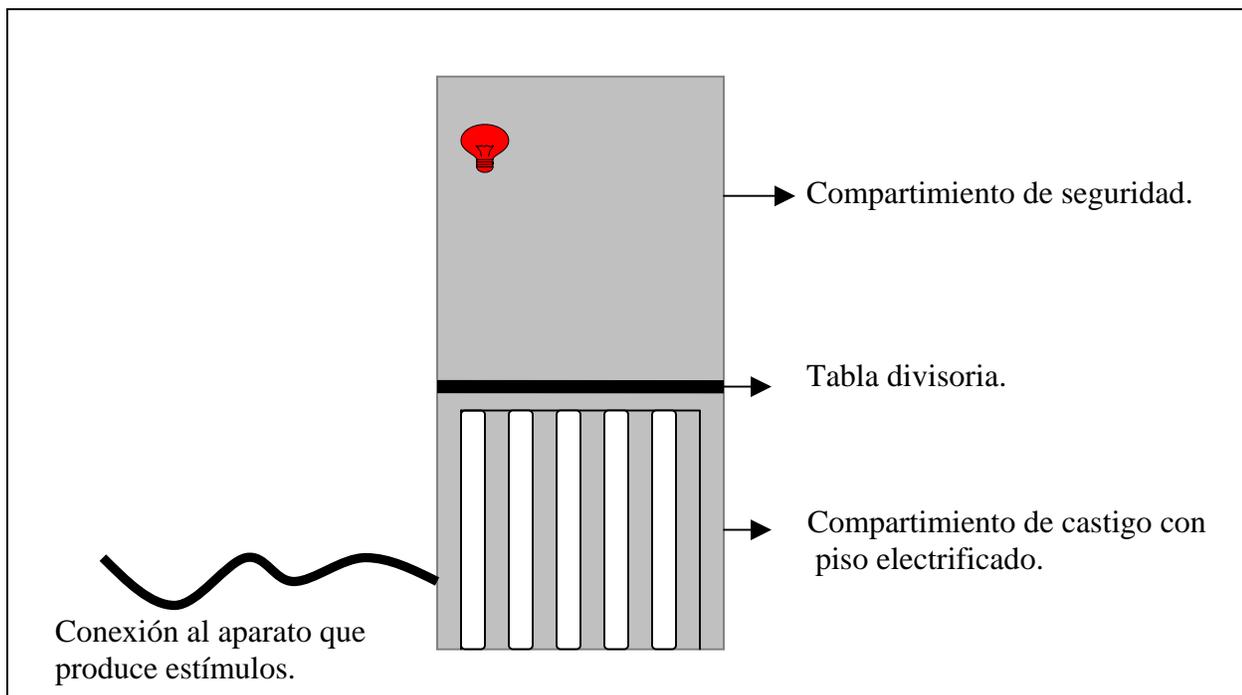


Figura 7.6 Vista superior del aparato para realizar pruebas de memoria.

El sistema de la figura 7.5 y 7.6 consistió en una cámara de dos compartimientos, uno de seguridad y otro de castigo, las cuales se podían separar a conveniencia por medio de una tabla negra divisoria; el compartimiento de seguridad estuvo iluminado con un foco de 25 watts de color rojo con piso liso y el compartimiento de castigo era oscuro con piso electrificado. Se introdujo a cada una de las ratas de los diferentes grupos por separado, primero en el compartimiento de seguridad por un lapso de 10 segundos, una vez transcurrido este tiempo se retiró la división que había entre ambos compartimientos y se tomó el tiempo que requería la rata en pasar del compartimiento de seguridad al compartimiento de castigo (latencia de adquisición). Cuando la rata pasa al compartimiento de castigo se coloca nuevamente la división y se hace pasar electricidad a través del piso para producir los estímulos. Recibidos éstos se retira la división y se toma el tiempo que la rata requiere para trasladarse del compartimiento de castigo al compartimiento de seguridad (latencia de escape). Una vez determinados estos tiempos se colocaron las ratas en sus respectivas jaulas por un lapso de 10 minutos, pasado este tiempo se trasladaron las ratas al compartimiento de seguridad, el cual se encontró separado del otro compartimiento por medio de una tabla divisora, se dejó pasar 10 segundos, se retiró la división y se tomó el tiempo que la rata requería en pasar del compartimiento de seguridad al compartimiento de castigo, en este caso ya no había estímulo. El ratón tiende espontáneamente a ir a los espacios oscuros; pero en esta prueba se le enseña a asociar el espacio oscuro (en principio, el más apetecible) con una consecuencia desagradable, una descarga eléctrica. Posteriormente, se colocaron en sus respectivas jaulas y se mantuvieron ahí por 24 horas. Transcurrido dicho tiempo se realizó nuevamente el mismo procedimiento, colocando las ratas en el compartimiento de seguridad, el cual se encontró separado del compartimiento de castigo, se dejó pasar 10 segundos, se retiró la división y se tomó el tiempo en el que la rata requería en pasar del compartimiento de seguridad al compartimiento de castigo, en este caso tampoco había estímulo.

Cuando se trasladaban las ratas a los diferentes compartimientos se recogieron los excrementos para evitar posibles transferencias de olores.

Una vez finalizada la prueba de memoria se sacrificaron las ratas por decapitación para obtener una región cerebral (cuerpo estriado).

7.4.4 Determinación de peroxidación de lípidos en homogenizados de tejidos cerebrales con ácido tiobarbitúrico (Malondialdehído).¹⁰

La región cerebral de cada una de las ratas de los diferentes tratamientos se colocaron en tubos viales de plástico, se homogenizaron con 1mL de PBS empleando un homogenizador de metal. Una vez homogenizados los tejidos se guardaron en el refrigerador para mantenerlos a -80C para su posterior determinación.

Se descongelaron las muestras a temperatura ambiente, se tomaron 10µL del homogenizado mediante una micropipeta y se colocaron en tubos viales de plástico de 1mL.

Se adicionó a la muestra 100µL de TRIS. Posteriormente los tubos se incubaron a 37°C durante 30 minutos para lo cual se utilizó un sistema adaptado con el fin de que los tubos flotaran en el agua.

Se tomaron 40 µL del incubado y se añadieron:

- a) 150µL de ácido acético (esto detiene la reacción)
- b) 150µL de ácido tiobarbitúrico
- c) 50µL de H₂O

Después se calentaron los tubos a ebullición durante 45 minutos, colocando los tubos en el baño hasta que el agua estaba a 92°C. Se añadieron 100µL de KCl y se agitaron en vortex por un lapso de 1 minuto. Se añadió 500µL de butanol-piridina, se agitó y posteriormente se centrifugó a 3000r.p.m por 5 minutos. Se tomó la fracción superior de la muestra y se leyó a 532nm en el espectrofotómetro.

Por otro lado se llevó a cabo el procedimiento con H₂O el cual se utilizó como blanco. Para realizar la curva de calibración se utilizó Malonaldehído (1,1,3,3-tetrametoxipropanol).

7.4.5 Determinación de glutatión peroxidasa en homogenizados de tejidos cerebrales.

La técnica original fue empleada para medir la actividad de GPx fue descrita por Mills (1959) y modificada por Hafeman (1973).

En un tubo de ensayo se colocó 30µL del homogenizado de cada muestra y se le adicionó 1mL de glutatión reducido 2mM, 1mL de buffer de fosfato dibásico de sodio 0.4M (pH 7.0) con EDTA en una concentración 0.4mM y 1.47mL de agua desionizada para completar un volumen de 2.0mL.

Se incubaron los tubos durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente se adicionó a cada tubo 1mL de peróxido de hidrógeno 1.25mM preincubado a 37°C. Se volvieron a incubar los tubos 3 minutos más a la misma temperatura.

Se tomaron 0.5ml del incubado y se añadieron:

- a) 2mL de una solución de: 1.67g de ácido metafosfórico glacial, 0.2g de EDTA y 30g de cloruro de sodio en 100mL de agua destilada.

Se agitaron los tubos y se centrifugan durante 15 minutos a 3500 r.p.m.

Se tomaron 2mL del sobrenadante de cada centrifugado y se añadieron:

- a) 2mL de buffer de fosfato de sodio dibásico 0.4M
- b) 1mL de ácido 5, 5' - ditiobis (2-nitrobenzoico)

Dos minutos después se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 412nm.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 Estabilidad del agua

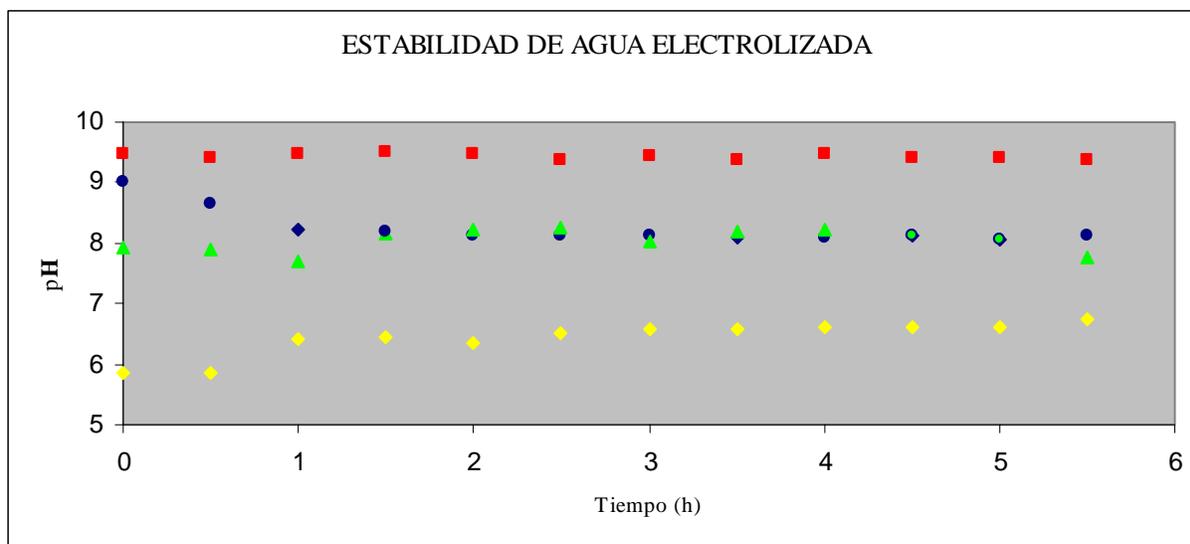
Se obtuvo agua electrolizada como lo muestra la figura 7.2. Se realizaron distintos experimentos con el objeto de encontrar las mejores condiciones para obtener AR (catódica) con potencial redox lo más negativo posible y AO (anódica) con potencial redox lo más positivo posible. Sin embargo como el potencial redox es proporcional al pH había un compromiso para no generar agua catódica muy alcalina ni agua anódica muy ácida.

Las variables óptimas que fueron seleccionadas para generar los distintos tipos de agua fueron: densidad de corriente de 5mA/cm², el flujo catódico y anódico fue de 1.33 y 1.733mL/seg respectivamente; el ánodo fue de dióxido de rutenio sobre titanio y el cátodo de acero inoxidable; el diafragma fue una membrana de intercambio iónico.

Como se mencionó en el método, después de electrolizar el agua se midió el pH y el potencial redox del AO, AR, AM y agua sin electrolizar. Los cuatro tipos de agua se guardaron en botellas de plástico y se taparon herméticamente.

Al aumentar el pH, el potencial redox aumenta hacia valores más negativos. Un agua con un potencial redox más negativo es más antioxidante. Por tanto si el pH y el potencial redox disminuyen en su valor absoluto se dice que esta perdiendo su actividad. Por lo tanto es muy importante saber el cambio de estas propiedades fisicoquímicas en el tiempo.

En la gráfica 8.1, se muestra el cambio de pH de los distintos tipos de agua durante 6 horas. Se seleccionó este periodo de tiempo, porque es el lapso entre la producción de agua electrolizada y su administración en las ratas.

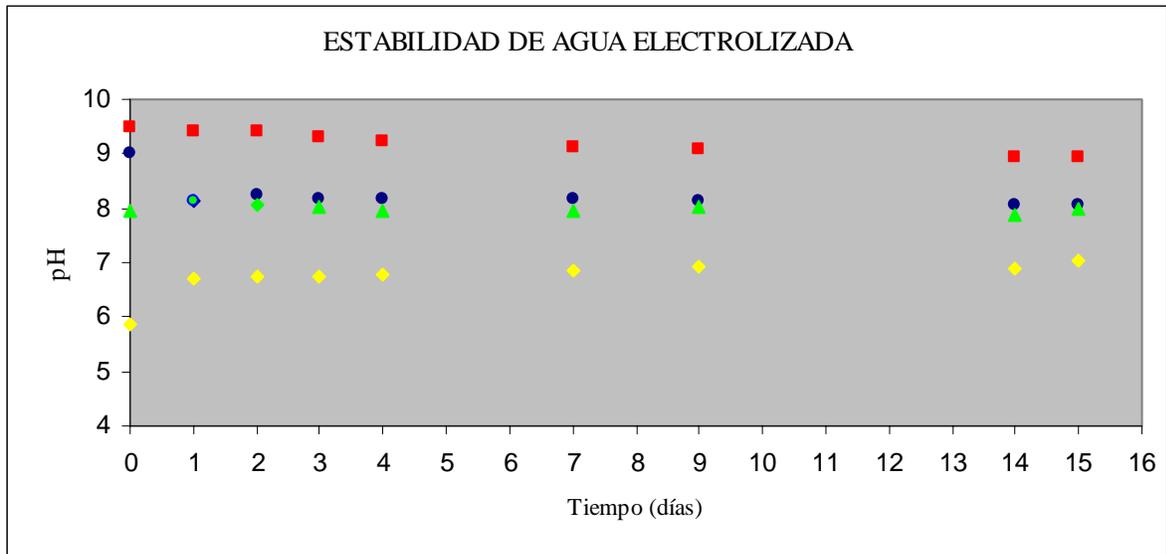


Grafica 8.1. Estabilidad del agua electrolizada contra tiempo (pH vs h).

Agua reducida ■ ; agua oxidada ▲ ; agua mezcla ● ; agua sin electrolizar ▲

Como se puede observar en la gráfica anterior, el pH del agua electrolizada cambia en los primeros 60 minutos, pero sin mostrar cambios bruscos.

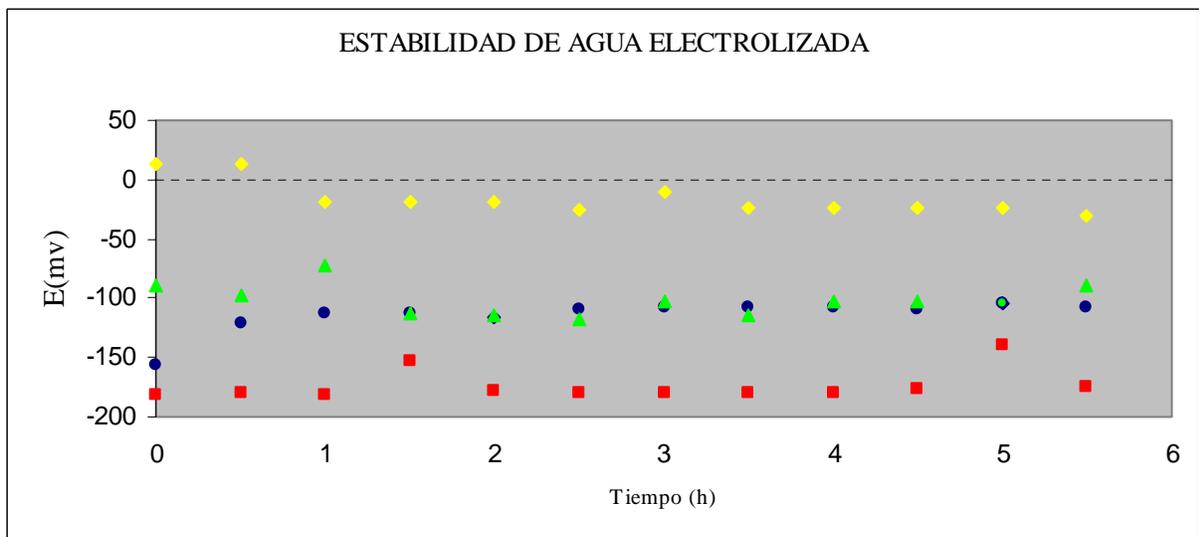
Posteriormente se midió esta misma propiedad pero por días.



Grafica 8.2. Estabilidad del agua electrolizada contra tiempo (pH vs días).

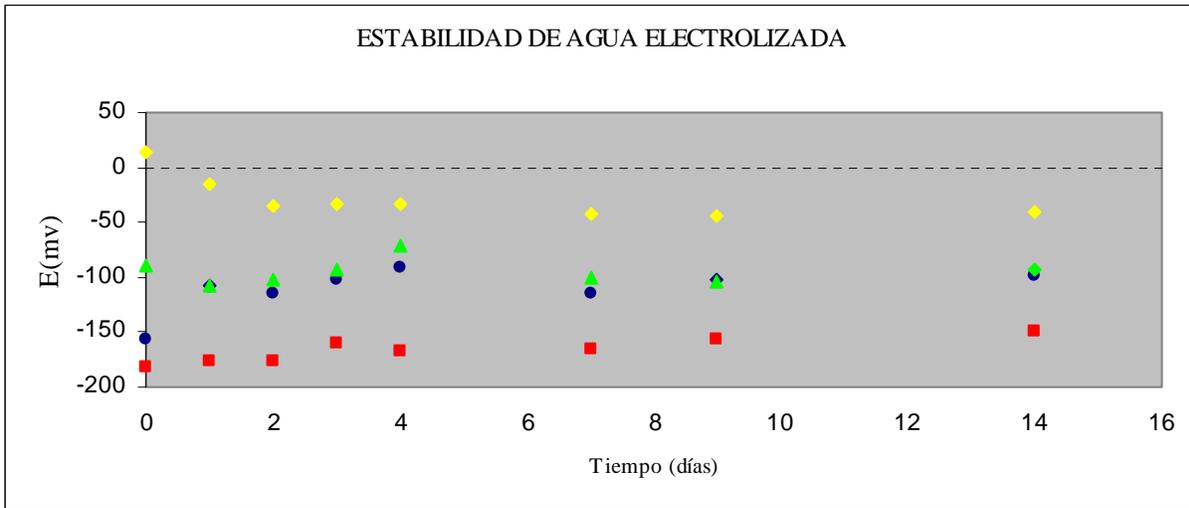
Agua reducida ■ ; agua oxidada ◆ ; agua mezcla ● ; agua sin electrolizar ▲

Como se puede observar en ambas gráficas 8.1 y 8.2, tanto en el agua oxidada, el agua reducida y la mezcla tienden a tener el mismo pH que el agua sin electrolizar con el paso del tiempo. Lo mismo sucede con el potencial redox, gráfica 8.3 y 8.4.



Grafica 8.3. Estabilidad del agua electrolizada contra tiempo (Potencial redox vs h).

Agua reducida ■ ; agua oxidada ◆ ; agua mezcla ● ; agua sin electrolizada.▲

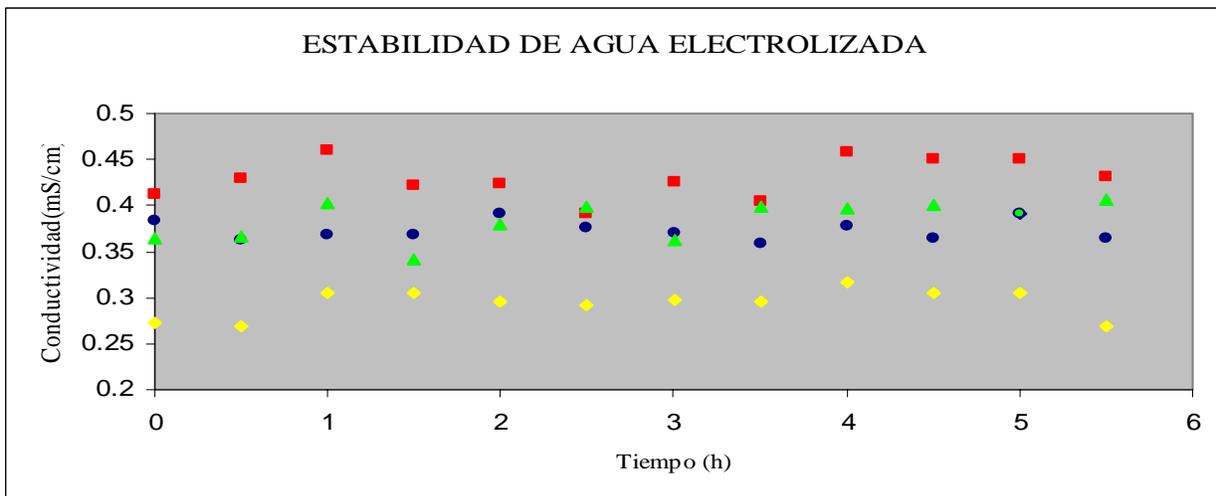


Gráfica 8.4. Estabilidad del agua electrolizada contra tiempo (potencial redox vs días).

Agua reducida ■ ; agua oxidada ◆ ; agua mezcla ● ; agua sin electrolizar ▲

En las gráficas anteriores, el pH y el potencial redox de los distintos tipos de agua electrolizada cambian con el tiempo.

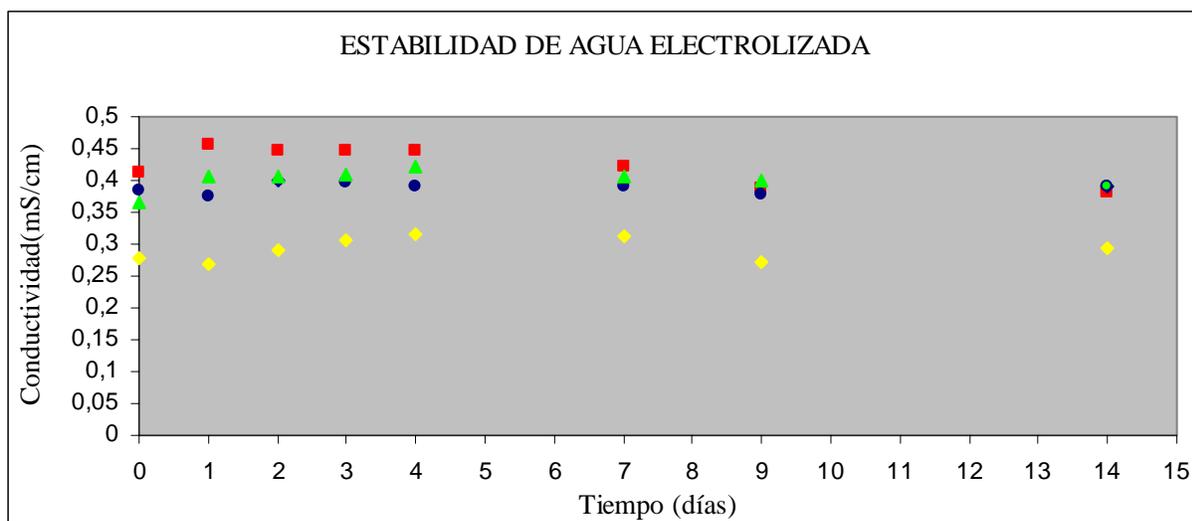
Por otro lado también se midió la conductividad de los distintos tipos de agua electrolizada, gráfica 8.5 y 8.6.



Gráfica 8.5. Estabilidad del agua electrolizada contra tiempo (conductividad vs h).

Agua reducida ■ ; agua oxidada ◆ ; agua mezcla ● ; agua sin electrolizar ▲

También se determinó la conductividad pero en los diferentes días.



Grafica 8.6. Estabilidad del agua electrolizada contra tiempo (conductividad vs días).

Agua reducida ■ ; agua oxidada ◆ ; agua mezcla ● ; agua sin electrolizar ▲

Todas las propiedades fisicoquímicas (pH, potencial redox y conductividad) que se midieron a los distintos tipos de agua electrolizada tienden, con el paso del tiempo, a tenerlas mismas propiedades que el agua sin electrolizar. Por tal motivo, se consideró más apropiado administrar el agua después de su electrolisis para evitar que estas perdieran dichas propiedades.

8.2 Administración de agua electrolizada a ratas

Para este experimento se llevó a cabo la electrolisis del agua a una densidad de corriente de 5mA/cm².

Una vez electrolizada el agua se midió el pH y el potencial redox de los diferentes tipos de aguas cuyos valores se encuentran en los rangos que se muestran en la tabla 8.1.

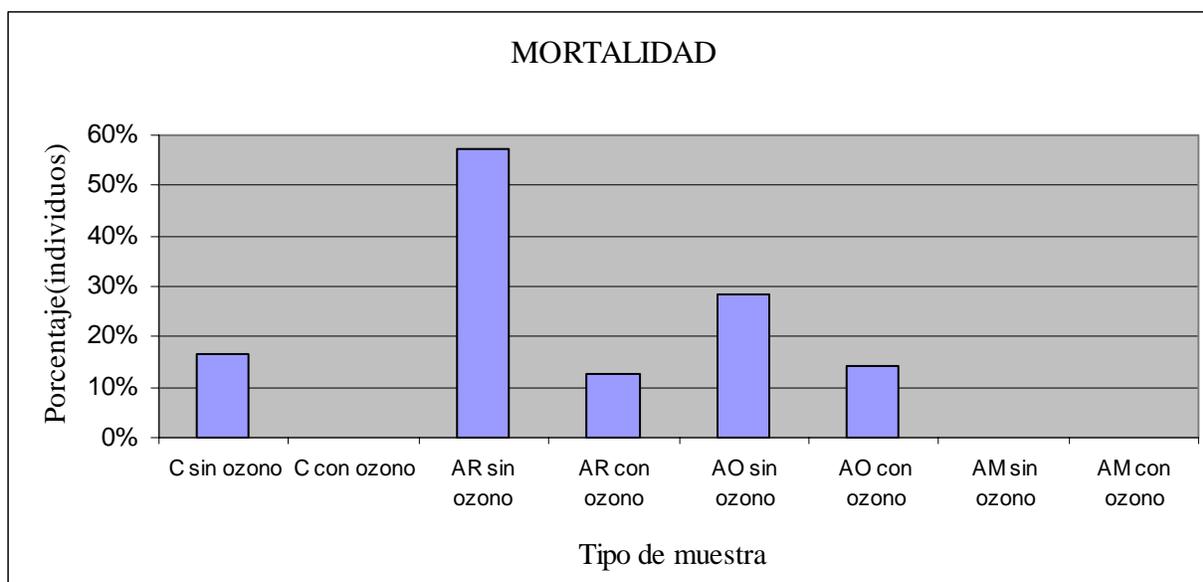
Tabla 8.1. Propiedades fisicoquímicas de los distintos tipos de agua que se administraron en ratas

Tipo de agua	pH	E (mv)
Agua catódica	9.92 ± 0.30	-184.46
Agua anódica	5.89 ± 0.30	+21.42
Agua mezcla de ambas	7.80 ± 0.30	-85.04
Agua sin electrolizar	7.50 ± 0.20	-64.96

Estos valores de pH y potencial redox fueron los que tenían las respectivas aguas que se administraron en las ratas durante los 30 días que duró el experimento.

8.3 Influencia del agua electrolizada sobre la mortalidad de las ratas

Durante el periodo de los 30 días, algunas ratas murieron.



Gráfica 8.7. Mortalidad (porcentaje individuos vs tipo de muestra). C: ratas tratadas con agua sin electrolizar. AR: ratas tratadas con agua reducida (cátodo). AO: ratas tratadas con agua oxidada (ánodo). AM: ratas tratadas con mezcla de ambas aguas (cátodo y ánodo).

Las ratas tratadas con ozono muestran una tasa de mortalidad menor que las ratas sin tratamiento con ozono, posiblemente se debe a que las células pueden tolerar un poco de estrés oxidativo lo cual lleva a una activación en la síntesis de enzimas de los sistemas de defensa de antioxidantes y lo realiza para evitar perder un equilibrio, como tales sistemas de defensas se activan, la rata tienden a soportar más debido a que sus defensas están elevadas, más que las ratas sin tratamiento con ozono.⁽⁷⁾

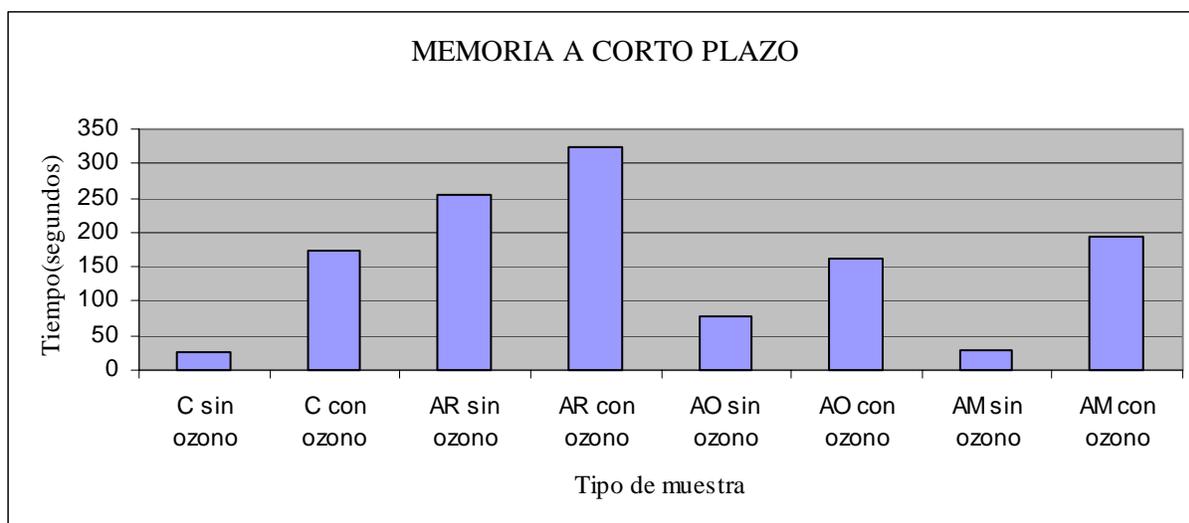
Las ratas control sin ozono muestran un tasa de mortalidad del 17% mientras que las ratas a las que se les administró AM no hubo mortalidad.

Para tener una conclusión más contundente con respecto a la mortalidad de las ratas se considera importante realizar el experimento con un mayor número de ellas.

8.4 Prueba de memoria

Se realizó la prueba de memoria según lo establecido en la parte experimental midiendo latencia de adquisición, de escape y posteriormente midiendo la memoria a los 10 minutos (memoria a corto plazo) y a las 24 horas (memoria a largo plazo).

Cuando hay un nivel alto de oxidantes el resultado que se obtiene es un estado de estrés oxidativo y habrá daño en el sistema. El estrés oxidativo va a causar daño en las neuronas provocando una neurodegeneración, lo cual se va a poder observar mediante la medición de la memoria en las ratas.¹³

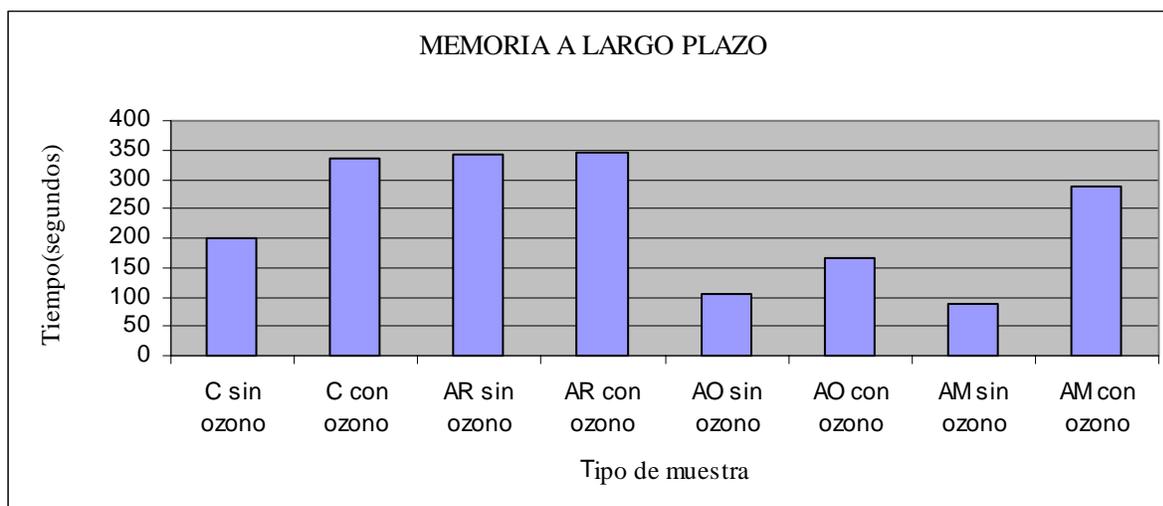


Gráfica 8.8. Memoria a corto plazo (segundos vs tipo de muestra). C: ratas tratadas con agua sin electrolizar. AR: ratas tratadas con agua reducida (cátodo). AO: ratas tratadas con agua oxidada (ánodo). AM: ratas tratadas con mezcla de ambas aguas (cátodo y ánodo).

En la gráfica 8.8 se observa que las ratas tratadas con ozono muestran una mayor memoria que las ratas sin tratamiento con ozono, esto posiblemente se debe a lo mencionado anteriormente, que las ratas pueden soportar un poco de estrés oxidativo y al estarlo soportando se activan sus defensas antioxidantes dando como resultado un mejoramiento general en su sistema.

También se observa en esta gráfica que de los dos grupos de ratas (con ozono y sin ozono), las que fueron tratadas con agua catódica tienen más memoria, esto posiblemente se debe a que el agua catódica pudiera estar actuando como antioxidante debido a sus radicales hidrógeno que tienen presentes.

El agua catódica pudiera estar ayudando a regenerar el daño provocado por los oxidantes, mejorando de esta forma la memoria.



Gráfica 8.9. Memoria a largo plazo (segundos vs tipo de muestra). C: ratas tratadas con agua sin electrolizar. AR: ratas tratadas con agua reducida (cátodo). AO: ratas tratadas con agua oxidada (ánodo). AM: ratas tratadas con mezcla de ambas aguas (cátodo y ánodo).

En este caso se muestra algo similar que en la memoria a corto plazo, las ratas tratadas con ozono tienen una mayor retención que las ratas sin tratamiento con ozono, de igual manera tanto en la memoria a largo como a corto plazo el cátodo es el que muestra una mayor memoria.

En este caso se muestra que con agua catódica se obtienen mejores resultados con lo que respecta a memoria, pero con lo que respecta a mortalidad no, ya que las muestras tratadas con agua catódica fueron las que mostraron una mayor tasa de mortalidad, esto posiblemente se debe a que en los organismos se trata de guardar un equilibrio, entre estos equilibrios está el pH, el agua catódica tenía un pH aproximado de 9.98, alcalina, al administrarles el agua se pudo alterar este equilibrio provocando así su muerte, en cambio el agua de mezcla era ligeramente alcalina con un pH aproximado de 7.78 lo cual es soportable para los sistemas. El agua sin electrolizar tenía un pH de alrededor de 7.5, quizás por este motivo su tasa de mortalidad fue menor.

La memoria de las ratas tratadas con AM tiende a comportarse de manera similar que la memoria de las ratas tratadas con AR y esto es posiblemente porque tiene también radicales hidrógeno pero en menor proporción que el AR.

Para tener más elementos que soporten los resultados anteriores se procedió a realizar la determinación de peroxidación de lípidos por medio de determinación del MDA y la determinación de la enzima glutatión peroxidasa.

8.5 Determinación de peroxidación de lípidos en homogenizados de tejidos con ácido tiobarbitúrico (Malondialdehído).

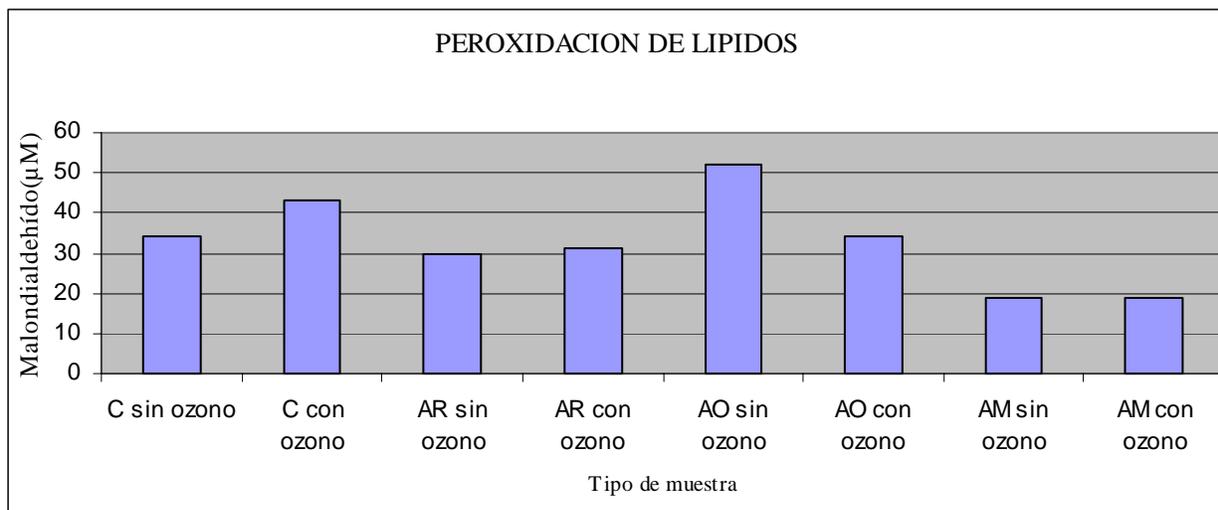
Cuando hay concentraciones elevadas de oxidantes en los organismos van a provocar el deterioro de los lípidos poliinsaturados, al ser degradados conducen de manera directa o indirecta, a la obtención de malondialdehído como producto final, el cual es extremadamente reactivo y puede ser determinado por la prueba de TBA, a esto se le llama peroxidación de lípidos (lipoperoxidación).

Los niveles de MDA en las ratas tratadas con los diferentes tipos de agua se llevaron a cabo conforme a lo reportado en la literatura.²⁷ Esta determinación se llevó a cabo en el cuerpo estriado de cada una de las ratas. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado promediando los tres valores más cercanos:

Tabla 8.2 Determinación de peroxidación de lípidos.

Muestras sin ozono	Muestras con ozono
Control $34 \pm 0.3\mu\text{M}$	Control $43 \pm 5\mu\text{M}$
Cátodo $30 \pm 2\mu\text{M}$	Cátodo $31 \pm 5\mu\text{M}$
Ánodo $52 \pm 5\mu\text{M}$	Ánodo $34 \pm 5\mu\text{M}$
Mezcla $19 \pm 2\mu\text{M}$	Mezcla $19 \pm 0.5\mu\text{M}$

Los resultados de la tabla anterior se muestran en la gráfica 8.10.



Gráfica 8.10. Peroxidación de lípidos (concentración de MDA vs tipo de muestra). C: ratas tratadas con agua sin electrolizar. AR: ratas tratadas con agua reducida (cátodo). AO: ratas tratadas con agua oxidada (ánodo). AM: ratas tratadas con mezcla de ambas aguas (cátodo y ánodo).

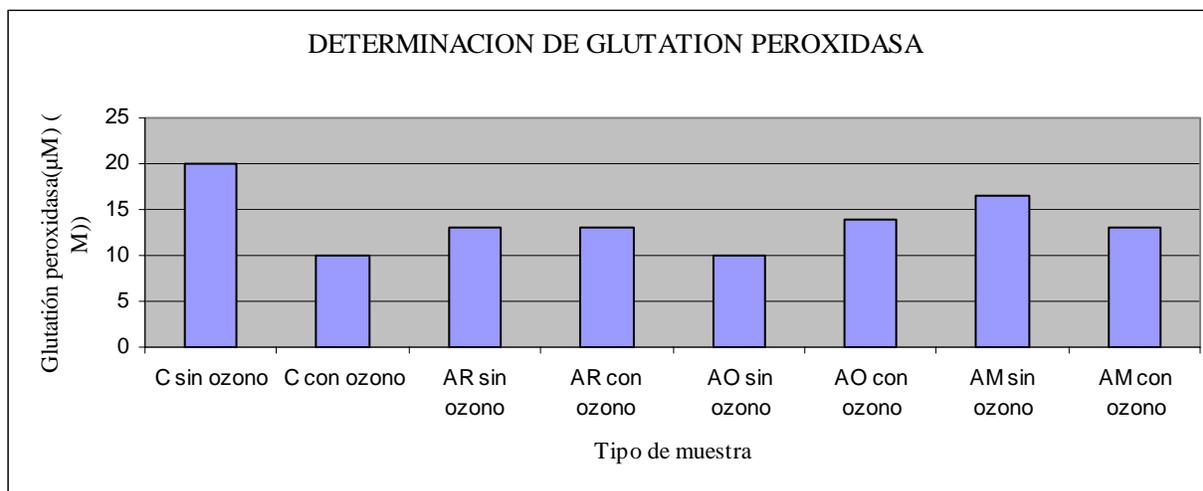
En esta gráfica se muestra que las ratas tratadas con agua catódica tienen una concentración ligeramente menor de malondialdehído que las ratas control. Esto posiblemente se debe a la capacidad antioxidante que se dice tiene el agua catódica.^{5,6}

Como era de esperarse, las ratas tratadas con agua anódica presentaron mayores cantidades de malondialdehído. El AO tiene cantidades elevadas de oxígeno y pudiera ser el factor que favorezca el aumento de oxidantes, generando de esta forma mayores niveles en la peroxidación de lípidos.

Con los resultados mostrados en la gráfica 8.10, se concluye que de todos los tratamientos el mejor fue el de agua de mezcla tanto para las muestras con ozono como sin ozono, ya que a diferencia del control se reduce casi a la mitad la peroxidación de lípidos. Esto quiere decir que con AM se redujeron los oxidantes que causan la lipoperoxidación. Establecer una hipótesis sobre la forma en que actúa el agua de mezcla para reducir los niveles de peroxidación de lípidos sería muy aventurado, ya que en los procesos bioquímicos existen rutas metabólicas que se entrecruzan. Por tal motivo se hace necesario cuantificar otros factores que intervienen en estos procesos.

8.6 Determinación de glutatión peroxidasa en homogenizados de tejidos cerebrales.

Los antioxidantes incluyen enzimas que son piedra angular en los sistemas protectores y evitan el incremento excesivo de especies oxidables no deseables, tales como: el superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) y también las vitaminas que protegen a los tejidos de los efectos que pueden causar los ROS y los radicales libres, en este estudio se determinó sólo una de estas enzimas la cual fue GPx. Los resultados se muestran en la gráfica 8.11.



Gráfica 8.11. Determinación de Glutatión peroxidasa. (concentración vs tipo de muestra). C: ratas tratadas con agua sin electrolizar. AR: ratas tratadas con agua reducida (cátodo). AO: ratas tratadas con agua oxidada (ánodo). AM: ratas tratadas con mezcla de ambas aguas (cátodo y ánodo).

Los valores de GPx en todos los grupos de ratas estudiadas no cambian apreciablemente, gráfica 8.11.

En este estudio se esperó que la concentración de GPx aumentara en las ratas tratadas con agua de mezcla ya que estas tuvieron los menores niveles en peroxidación de lípidos. Pudiera ser que el agua de mezcla esté actuando en otra enzima u otro sistema antioxidante que no sea GPx.

9. CONCLUSION

En este trabajo se llevó a cabo la producción de agua electrolizada y su influencia en ratas viejas (2 años 3 meses) con estrés oxidativo.

En primera estancia se realizaron estudios de estabilidad para los distintos tipos de aguas electrolizada (catódica, anódica, y mezcla de ambas) llegando a la conclusión de que es necesario elaborar agua diariamente para administrárselas a las ratas, ya que perdían sus propiedades fisicoquímicas, tales como pH, potencial redox y conductividad al pasar el tiempo.

La producción de agua electrolizada se realizó en una celda dividida de flujo continuo, con el objeto de suministrarla a los distintos grupos de ratas por un periodo de 1 mes.

Las ratas tratadas sin ozono administrándoles agua reducida con un pH de 9.92 presentaron mayor tasa de mortalidad (aproximadamente 55%). Por otro lado, las ratas tratadas con y sin ozono administrándoles AM no presentaron mortalidad.

Se determinó el efecto que tuvo el agua electrolizada con respecto a la memoria de ratas con estrés oxidativo. Las ratas tratadas con ozono tienen una mayor retención que las ratas sin tratamiento con ozono. Las ratas tratadas con el agua catódica muestran una mayor memoria a corto y a largo plazo que los otros grupos de ratas. Las ratas tratadas con agua de mezcla mejora la memoria a largo plazo.

Por otro lado se determinó la peroxidación lipídica de las diferentes muestras de ratas. Las ratas tratadas con y sin ozono mostraron una disminución hasta de un 50% en los niveles de peroxidación de lípidos respecto a los controles cuando se les administró agua de mezcla.

Tomando en cuenta las diferentes respuestas que mostraron las ratas viejas con estrés oxidativo al administrarles agua electrolizada tales como: mortalidad, prueba de memoria y lipoperoxidación, el agua que tiene un efecto benéfico en ellas es el tratamiento con la mezcla de AR y AO, ya que se pudo observar que no hubo mortalidad, la memoria de las ratas mejoró a largo plazo y con la lipoperoxidación disminuyó considerablemente respecto al control.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Bockris. John. O'M, Reddy Amulaya K.N. "Modern Electrochemistry. Ionics". Cap 1 Electrochemistry 1-10. Ed. Pelum press. Vol 1. USA 1998.
2. Milazzo Giulio. "Electrochemistry". Cap.9 "Nonmetallurgical electrolytic processes " 561-576. Ed Elsevier Publishing Company. USA 1980.
3. Bard Allen. J; Faulkner Larry R. "Electrochemical Methods". Cap. 1 Introduction and overview of Electrode processes. 1-18. Ed. John Wiley γ Sons, Inc. USA. 1980.
4. Raymond Chang "Química". Cap.19. Electroquímica 757-792. Ed. Mc Graw Hill. México 1991.
5. Nishimura T. Teruya K. *Cytotechnology* . **40**(1-3):139-149 (2002).
6. Shirahata, S. *Biochem. Byophys. Res. Commun* **234**, 269-274 (1997).
7. CA 137: 165246v (2002)
8. CA 134:202583 (2001)
9. CA 137:342159 (2002)
10. CA 137:165246v (2002)
11. CA 135:112068 (2001)
12. CA 133:205076 (2001)
13. CA 135:262201 (2001)
14. CA 134:99883 (2001)
15. CA 135: 111259 (2002)
16. Kim, Chyer; Hung, Yen-Con; Brackett, Robert E. *J. Food Prot.* **63** (1), 19-24 (2000)
17. CA 135:355166 (2002)
18. Park, Hoon; Hung, Yen-Con; Brakett, Robert E. *International Journal of Food Microbiology* **72** (1-2), 77-83 (2002).
19. CA 134:352397 (2001)
20. CA 133:205076 (2001)

21. B. Halliwell. B, J.M.C. Gutteridge. "Free radicals in Biology and Medicine". Ed.Oxford.Claredon press. USA 2001.
22. A.Z. Reznick, L. Packer, C.K. Sen, J.O. Holloszy, M.J. Jackson. "Oxidative stress in skeletal muscle". Cap. Free radicals and oxidative damage in biology and medicine 1-24. Cap. Strategies to assess oxidative stress pp. 43-51 Ed. MCBU Molecular and Cell Biology Updates. Germany Berlín 1998.
23. Bensasson R.V. E.J. Land, T.G. Truscott "Excited states and free radicals in Biology and Medicine". Cap 4. Activated forms of oxygen 102-105. Ed. Oxford University Press. USA 1993.
24. Gilbert and Colton. "Reactive oxygen species in biological systems" Ed. Kluwer Academic/ Plenum publishers. USA 1999.
25. Forman Henry J. Cárdenas Enrique. "Oxidative stress and signal transduction". Oxidative stress introduction. Ed. Chapman γ Hall. USA 1997.
26. Scandalios. J.G. " Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses" Cap. Oxidant, antioxidants and aging 201,248, 249. Ed. Cold spring Harbor laboratory press. USA 1997.
27. Lunec.J, Griffiths. H.R. " Measuring in vivo Oxidative Damage" A practical Approach". Ed. John Wiley & Sons, ltd. Part. 1 Chromatographic Procedures 9-12. USA 2000.
28. Lester Packer. Midori Hiramatsu. Toshikazu Yoshikawa. "Free radicals in brain physiology and disorders" . Ed. Academic press. USA 1996.
29. Griffith. John. Q. Edmond. J. Farris "The rat in laboratory investigation". Cap 10. Techniques for the Investigation of Psychological Phenomena in the rat 199-217. Ed. Lippincott Company. USA 1980.
30. Helmut Sies "Oxidative stress oxidants and antioxidants". Cap 1. Ocurrance of oxidants. Oxygen radicals and air pollution 3-24, 35-46 Ed. Academic press. Germany 1991.
31. Sami Ahmad "Oxidative stress and antioxidants defenses in biology" Cap 2 Pathophysiology and reactive oxygen metabolites. Central nervous system injury 81-84 Ed. Chapman γ Hall,USA (1995).
32. Thompson Richard. F. "The Brain". A neuroscience primer. Ed. Worth publishers. USA 2000.
33. Favier A.E, Cardet. J. Kalyanaraman B. Pierre J.L. "Analysis of free radicals in biological systems". Cap. 6 Reactive oxidant species in rat brain extracellular fluid 109-115. Ed. Birkhäuser Verlag. Germany 1995.

11. ANEXO

Revisión en Chemical Abstracts sobre la producción y usos del agua electrolizada (2000-2003)

135:170428

Method and apparatus for treatment of water for manufacture of acidic water and alkaline water. Oguchi, Tomohisa; Mashimo, Toru; Saito, Isamu; Ariji, Toshio (Japan Steel Works, Ltd., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2001219166.A2 14 Aug 2001, 7 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: C02F001-46. ICS: B01D019-00; C02F001-20. APPLICATION: JP 2000-29060 7 Feb 2000. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 61 (Water). Water is electrolyzed to give alk. water and acidic water, and then the acidic water is degassed for removing Cl as Cl₂(g). The degassed acidic water may be mixed with the alk. water for specific uses. The acidic water can be used alone as Cl-free face lotions or less corrosive water, or may be mixed with the alk. water again to give weakly alk. water which is less corrosive to water supply pipes. The app. is equipped with a water electrolytic tank having outlets for both of the alk. and acidic water in which the acidic water outlet is connected with a degassing part.

135:170436

Portable acidic electrolyzed water atomizers, acidic electrolyzed water manufacturing apparatus, and acidic electrolyzed water manufacturing kits. Hoshino, Masaaki; Saruhashi, Makoto; Sasaki, Masatomi (Terumo Corp., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2001225074 A2 21 Aug 2001, 7 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: C02F001-46. ICS: C25B001-00; C25B009-00. APPLICATION: JP 2000-38934 17 Feb 2000. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 61 (Water). The atomizer comprises a container for 10-150 mL acidic water and a detachable means for atomizing and/or jetting of water. The app. For manuf. of the acidic electrolyzed water is equipped with a means for attaching the atomizer. The title kits comprise the atomizers and the acidic water manufg. app. The acidic water is used for sterilization, for disinfection, as astringents, etc. Acidic water can be carried anywhere in pockets, handbags, etc.

135:248539

Hydrogen particles and supersaturation in alkaline water from an alkali-ion-water electrolyzer. Kikuchi, Kenji; Takeda, Hiroko; Rabolt, Beatrice; Okaya, Takuji; Ogumi, Zempachi; Saihara, Yasuhiro; Noguchi, Hiroyuki (Department of Materials Science, The University of Shiga Prefecture, Hassaka, Hikone, Shiga 522-8533, Japan). J. Electroanal. Chem., 506(1), 22-27 (English) 2001 Elsevier Science S.A. CODEN: JECHES. ISSN: 0368-1874. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 72 (Electrochemistry) Section cross-reference(s): 67, 73. The hydrogen content in alk. water obtained from an electrolytic flow cell was examd. by measuring the diam. distribution of hydrogen microbubbles (hydrogen particles) in electrolyzed alk. water using the dynamic light scattering (DLS) method. The influence of electrolysis conditions on the hydrogen content and the diam. distribution of hydrogen particles were also examd. The diam. of hydrogen particles changes rapidly with elapsed time after electrolysis, indicating that hydrogen particles grow to form large particles. The distribution of the particle diam. shows two peaks. The mean diam. of hydrogen particles is distributed mainly between 20 and 300 nm. The mean diam. decreases with an increasing c.d. up to 0.03 A dm⁻². The diam. Of hydrogen particles is

smaller than the equil. diam. obtained by the concn. of dissolved hydrogen, suggesting that the electrolyzed water is a transition state from supersatd. to satd. solns. Hydrogen exists in particles as a colloidal soln. in a region of hydrogen content in electrolyzed water above 0.75 mM, which represents the satn. concn. of the dissolved hydrogen.

135:369111

Roles of oxidation-reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for the inactivation of food-related pathogens. Kim, Chyer; Hung, Yen-Con; Brackett, Robert E. (Center for Food Safety and Quality Enhancement, Department of Food Science and Technology, College of Agricultural and Environmental Sciences, University of Georgia, Griffin, GA 30223-1797, USA). *J. Food Prot.*, 63(1), 19-24 (English) 2000 International Association for Food Protection. CODEN: JFPRDR. ISSN: 0362-028X. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 10 (Microbial, Algal, and Fungal Biochemistry) Section cross-reference(s): 17. This study investigates the properties of electrolyzed oxidizing (EO) water for the inactivation of pathogen and to evaluate the chem. modified solns. possessing properties similar to EO water in killing *Escherichia coli* O157:H7. A five-strain cocktail (1010 CFU/mL) of *E. coli* O157:H7 was subjected to deionized water (control), EO water with 10 mg/L residual chlorine (J.A.W-EO water), EO water with 56 mg/L residual chlorine (ROX-EO water), and chem. modified solns. Inactivation (8.88 log₁₀ CFU/mL redn.) of *E. coli* O157:H7 occurred within 30 s after application of EO water and chem. modified solns. contg. chlorine and 1% bromine. Iron was added to EO or chem. modified solns. to reduce oxidn.-redn. potential (ORP) readings and neutralizing buffer was added to neutralize chlorine. J.A. W-EO water with 100 mg/L iron, acetic acid soln., and chem. modified solns. contg. neutralizing buffer or 100 mg/L iron were ineffective in reducing the bacteria population. ROX-EO water with 100 mg/L iron was the only soln. still effective in inactivation of *E. coli* O157:H7 and having high ORP readings regardless of residual chlorine. These results suggest that it is possible to simulate EO water by chem. modifying deionized water and ORP of the soln. may be the primary factor affecting microbial inactivation.

134:221652

Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. Kim, Chyer; Hung, Yen-Con; Brackett, Robert E. (Center for Food Safety and Quality Enhancement, Department of Food Science and Technology, College of Agricultural and Environmental Sciences, University of Georgia, Griffin, GA 30223-1797, USA). *Int. J. Food Microbiol.*, 61(2-3), 199-207 (English) 2000 Elsevier Science Ltd. CODEN: IJFMDD. ISSN: 0168-1605. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 17 (Food and Feed Chemistry). This study was undertaken to evaluate the efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chem. modified water with properties similar to the EO water for inactivation of different types of foodborne pathogens (*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*). A five-strain cocktail of each microorganism was exposed to deionized water (control), EO water and chem. modified water. To evaluate the effect of individual properties (pH, oxidn.-redn. Potential (ORP) and residual chlorine) of treatment solns. on microbial inactivation, iron was added to reduce ORP readings and neutralizing buffer was added to neutralize chlorine. Inactivation of *E. coli* O157:H7 occurred within 30 s after application of JAW EO water with 10 mg/L residual chlorine and chem. modified solns. contg. 13 mg/L residual chlorine. Inactivation of Gram-pos. and -neg. microorganisms occurred within 10 s after application of ROX EO water with 56 mg/L

residual chlorine and chem. modified solns. contg. 60 mg/l residual chlorine. *B. cereus* was more resistant to the treatments than *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* and only 3 log₁₀ redns. were achieved after 10 s of ROX EO water treatment. *B. cereus* spores were the most resistant pathogen. However, more than 3 log₁₀ redns. were achieved with 120-s EO water treatment.

135:274604

Electrolytic water for cleaning, production method thereof, and cleaning system for cloths and tableware therewith. Otaguro, Takahiro; Kashiwada, Toshinobu (Lion Corp., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2001271098 A2 2 Oct 2001, 26 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: C11D017-00. ICS: A47L015-44; B08B003-08; C02F001-46; C11D003-04; C11D003-20; C11D003-30; C11D003-386; C11D003-43; C11D003-50; C11D011-00; C25B009-00; D06F039-02. APPLICATION: JP 2000-85136 24 Mar 2000. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 46 (Surface Active Agents and Detergents) Section cross-reference(s): 61. Title water is obtained by electrolysis of (electrolytic) water contg. (a) electrolytes, (b) metal chelating agents, and optionally (c) surfactants and/or solvents. Thus, a water soln. contg. 30% sodium chloride, 6% DTPA 5Na, and 30% ethoxylated Diadol 13 was electrolyzed showing no scale deposition on the electrode or app. wall and the alk. electrolytic water soln. gave a good cleaning effect on a fabric.

135:170434

Small-sized apparatus for manufacture of electrolyzed water used for sterilization, for disinfection, as astringents, etc. Hoshino, Masaaki; Saruhashi, Makoto; Sasaki, Masatomi (Terumo Corp., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2001225072 A2 21 Aug 2001, 15 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: C02F001-46. APPLICATION: JP 2000-41627 18 Feb 2000.

DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 61 (Water). The app. comprises a treating water storage tank and an electrolysis tank equipped with a pair of electrodes which the lower end of the electrodes are not contacting the tank bottom. Water is fed into the electrolysis tank by dropping, and electrolyzed by its passing in between the electrodes. Remaining of water in between the electrodes, which causes unnecessary elec. current flow, is prevented. The app. is small-sized.

134:99884

Effect of acidic electrolyzed water on the microbial counts in shredded vegetables (Part III). Effect of combined physical supplementary means on the washing and disinfections. Koseki, Shigenobu; Itoh, Kazuhiko (Grad. Sch. Agric. Sci., Hokkaido Univ. Kita-9 Nishi-9, Kita-Ku, Sapporo 060-8589, Japan). Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 47(12), 914-918 (Japanese) 2000 Nippon Shokuhin Kagaku Kogakkai. CODEN: NSKKEF. ISSN: 1341-027X. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 17 (Food and Feed Chemistry). It has been shown that acidic electrolyzed water was effective in the surface disinfection of shredded vegetables. In the treatment shredded vegetables were simply soaked in acidic electrolyzed water so far. In this research, in the disinfection of shredded vegetables by acidic electrolyzed water, the effectiveness of phys. supplementary means used together was examd. Combined use of the phys. Supplementary means and acidic electrolyzed water did not contribute to disinfection. However, the phys. supplementary means was shown to be considerably effective when vegetables were washed with alk. electrolyzed water by phys. supplementary means and then disinfected in acidic electrolyzed water by the phys. Supplementary means. This effect was

remarkable on cucumbers, but little on lettuces and cabbages. Stirring was most effective among the supplementary means used. It was found out that five minutes each of washing and disinfecting was necessary for high disinfectant effect on cucumbers. Moreover, it was suggested that the effect of stirring was more effective than that of pretreatment of alk. electrolyzed water on cucumber disinfection.

135:170432

Water drop-type acidic electrolyzed water generators. Hoshino, Masaaki; Saruhashi, Makoto; Sasaki, Masatomi (Terumo Corp., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2001225071 A2 21 Aug 2001, 8 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: C02F001-46. APPLICATION: JP 2000-38935 17 Feb 2000. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 61 (Water). The app. comprises a treating water storage tank, a membrane-free electrolysis tank, nozzles for discharging acidic water, a power source, an elec. current controller, and an acidic water container. In the app., electrolysis of the treating water is carried out in the electrolysis tank by feeding of treating water by dropping from the storage tank. Acidic water suitable for use in sterilization, disinfection, as astringent, etc. are manufd. with high reproducibility. The app. is portable.

134:99883

Effect of acidic electrolyzed water on the microbial counts in shredded vegetables (Part II). Pretreatment effect of alkaline electrolyzed water. Koseki, Shigenobu; Itoh, Kazuhiko (Grad. Sch. Agric. Sci., Hokkaido Univ. Kita-9 Nishi-9, Kita-Ku, Sapporo 060-8589, Japan). Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 47(12), 907-913 (Japanese) 2000 Nippon Shokuhin Kagaku Kogakkai. CODEN: NSKKEF. ISSN: 1341-027X. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 17 (Food and Feed Chemistry). Electrolysis of dil. sodium chloride soln. produces alk. Electrolyzed water (AIEW) in the cathode side, simultaneously produces acidic electrolyzed water (AcEW) in the anode side. AIEW presents high pH (above 11) and extremely low ORP (below -800 mV). There has been no study attempting to use AIEW for washing shredded vegetables. Thus we examd. the availability of AIEW as wash water before disinfecting shredded vegetables (cabbages, lettuces, and cucumbers) with AcEW. Washing shredded vegetables by AIEW for one minute before disinfecting with AcEW was more effective than only disinfecting with AcEW for five minutes. Equally good results were ascertained among three different vegetables. Moreover, the activity of AcEW (high ORP and available chlorine concn.) was little declined when prewashing with any solns. (AIEW, 17 mM NaOH, and tap water) was applied before disinfecting. Although this effect was induced by not only AIEW hut also tap water and 17 mM NaOH, in view of the disinfectant effect, it is suggested that washing with AIEW before disinfecting would he suitable for shredded vegetables as an effective utilization of AIEW.

135:231458

Manufacture of reducing electrolyzed water. Arai, Kazuyoshi (Miz Co., Ltd., Japan). PCT Int. Appl. WO 2001066470 A1 13 Sep 2001, 15 pp. DESIGNATED STATES: W: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM; RW: AT, BE, BF, BJ, CF, CG, CH, CI, CM, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GA, GB, GR, IE, IT, LU, MC, ML, MR, NE, NL, PT, SE, SN, TD, TG. (Japanese). (World Intellectual Property

Organization). CODEN: PIXXD2. CLASS: ICM: C02F001-461. APPLICATION: WO 2000-JP1283 3 Mar 2000. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 61 (Water). Reducing water having pH £9.5 and redox potential £(-150)mV is prepd. by electrolyzing a raw water having pH 3-5.8. The raw water may contain an acid or CO₂.

135:268711

Effects of electrolyzed neutral water on the bacterial populations in a flower vase and in stems of cut roses. Izumi, Hidemi (Sch. Biol.-Oriented Sci. Technol., Kinki Univ., Wakayama 649-6493, Japan). *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 70(5), 599-601 (English) 2001 Engei Gakkai. CODEN: EGKZA9. ISSN: 0013-7626. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 5 (Agrochemical Bioregulators)

Stems of the flowering rose, 'Asami Red' were placed in 20° tap water (control) or electrolyzed neutral water (ENW; pH 6.8, 20 ppm available chlorine) for 7 days to evaluate their flower quality and shelf life. ENW reduced the occurrence and development of bent-neck, fresh wt. Loss, and the percentage of wilted leaves after day 3. The nos. of bacteria in the water and in the basal 3 cm segments of stems were 106 CFU×mL⁻¹ and 107 CFU×gFW⁻¹ on day 5, resp., whereas no bacteria was detected in the ENW. The bacterial population in the basal 3 cm of the control stems was 10 to 100 times higher than those in ENW throughout the holding period. Hydraulic conductance in the basal 3 cm of stems decreased dramatically by day 3, the decrease being greater in the stems in tap water than those in ENW.

135:262201

The use of electrolyzed solutions for the cleaning and disinfecting of dialyzers. Tanaka, Noriaki; Tanaka, Noriko; Fujisawa, Tatsuya; Daimon, Toshiya; Fujiwara, Kouichi; Yamamoto, Masanori; Abe, Tomiya (Kiyokai Tanaka-Kitanoda Hospital, Japan). *Artif. Organs*, 24(12), 921-928 (English) 2000 Blackwell Science, Inc. CODEN: ARORD7. ISSN: 0160-564X. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 63. (Pharmaceuticals). Recently, the use of electrolyzed solns. has attracted considerable interest in Japan. This study investigates the efficiency of electrolyzed solns. as disinfecting agents (DA) in the reuse of dialyzers and compares their efficiency to that of other disinfectants currently in use. The following 3 methods were employed. First, the rinsing time and rebound release of reused dialyzers were measured and compared after electrolyzed solns., electrolyzed strong acid aq. soln. (ESAAS) and electrolyzed strong basic aq. soln. (ESBAS), made from reverse osmosis (RO) water (ESAAS, ESBAS; Generating apparatuses: Super Oxseed a 1000, Amano Corporation, Yokohama, Japan), 2% Dialox-cj (Teijin Gambro Medical, Tokyo, Japan), and 3.8% formalin were used as DAs. This involved performing dialysis with 2 types of dialyzers: a cellulose acetate membrane (CAM) dialyzer and a polysulfone membrane (PSM) dialyzer. The dialyzers were cleaned and disinfected using the different DA and left for 48 h. Next, after performing dialysis the dialyzer membranes were cleaned with a saline soln. (0.9% NaCl) and RO water and then cleaned with the various DA. These membranes were obsd. using a scanning electron microscope (SEM) to check for the presence of phys. and biol. contaminants. Finally, in vitro tests were performed to det. the level of dialyzer clearance when PSM dialyzers were reused after having been cleaned and disinfected with the electrolyzed solns. The rinsing time results for both the CAM and PSM dialyzers showed the electrolyzed solns. (ESBAS and ESAAS) as being undetectable within 10 min. With regard to the rebound release, for both the CAM and PSM dialyzers, the electrolyzed solns. were undetectable at all checking times between 30 and 240 min. Observation by SEM showed that cleaning with both ESAAS and ESBAS left the fewest contaminants, and cleaning with 2% Dialox-cj left the

highest level of contaminants in the CAM dialyzers. With regard to expts. concerning use in vitro, no major changes in the dialyzer clearance were noticed after 6 uses. In every expt., the previous investigations showed the electrolyzed solns. to be superior to 3.8% formalin and 2% Dialox-cj DA for the reuse of dialyzers.

135:246610

Air purification apparatus using electrolyzed water. Shono, Nobuhiro; Kobayashi, Kazuhiro; Tanaka, Hiroki; Yamaguchi, Kaori (Toto Ltd., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2001252521 A2 18 Sep 2001, 4 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: B01D053-14. ICS: A61L009-01; A61L009-015; B01D047-06; F24F007-00. APPLICATION: JP 2000-70342 14 Mar 2000. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 59 (Air Pollution and Industrial Hygiene) Section cross-reference(s): 61, 72. The air purifn. app comprises a suction port, a discharge port, and a gas-liq. contact part for bringing air into contact with an aq. soln. produced by water electrolysis in an electrolytic bath having no diaphragm. The app. is capable of removing malodorous substances, airborne dust, and volatile org. compds. The aq. soln. may be acidic or alk. water.

135:111259

Comparison between two methods for measuring germicidal efficacy of electrolyzed oxidizing water with high redox potential. Chen, Guiqiu; Li, Aibin; Zhu, Yingkai; Huang, Wei; Zhou, Songhang (Huang Provincial Sanitary and Anti-epidemic Station, Changsha 410005, Peop. Rep. China). Zhongguo Xiaoduxue Zazhi, 18(1), 1-5 (Chinese) 2001 Zhongguo Xiaoduxue Zazhi Bianjibu. CODEN: ZXZAFO. ISSN: 1001-7658. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 59 (Air Pollution and Industrial Hygiene) Section cross-reference(s): 9, 10, 63 The electrolyzed oxidizing water (EOW) had redox potential of 1148-1165 mV, pH of 2.08-2.40, and available chlorine content of 23.37-54.28 mg/L. Its germicidal efficacy was measured by the suspension test and the on-carrier-surface test,. The killing rate of Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and spores of Bacillus subtilis var. niger in suspension exposed to EOW stock soln. for 1, 3, and 60 min was up to 100%, resp.; but 10, 10, and 240 min were required for killing 100% of the 3 kinds of bacteria on cloth strips, resp. The EOW stock soln. could destroy the antigenicity of HBsAg in suspension contg. 5% calf serum after contact for 0.5 min, while the antigenicity of Hbsag on stainless steel surface could not be destroyed after exposure for 90 min. The results showed that the contact time of EOW for killing the microorganisms in suspensions was shorter than that on carrier surface.

134:121005

Electrolyzed water for cleaning of ungulates, and method of cleaning them using the water. Achinami, Nobuo; Miyaji, Masato (Hoshizaki Electric Co., Ltd., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2001017016 A2 23 Jan 2001, 4 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: A01K013-00. ICS: A61K033-20; A61P017-00; A61P031-04; B08B003-08. APPLICATION: JP 1999-193928 8 Jul 1999. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 63 (Pharmaceuticals) Electrolyzed water manufd. from dild. aq. chloride soln. (e.g. aq. NaCl) is useful for cleaning and sterilization of ungulates for prevention of diseases. Also claimed is two-step cleansing using firstly alk. Water and secondly acidic water.

134:357445

Bactericidal action of strongly acidic electrolytic water. Hypochlorous acid produced by solubilization of generated chlorine is the main body of the effect. Iwasawa, Atsuo; Nakamura, Yoshiko (Fujigaoka Hosp., Showa Univ., Japan). *Kagaku to Seibutsu*, 39(4), 218-220 (Japanese) 2001 Gakkai Shuppan Senta. CODEN: KASEAA. ISSN: 0453-073X. DOCUMENT TYPE: Journal; General Review CA Section: 63 (Pharmaceuticals). A review with 3 refs., on characterization and bactericidal activities of strongly acidic electrolyzed water used for disinfection. Role of hypochlorous acid, produced by solubilization of generated chlorine, as a major bactericidal factor in strongly acidic electrolyzed water is also discussed.

135:355171

Efficacy of electrolyzed oxidizing water with high redox potential in killing microorganism and disinfecting gastroscop. He, Liping; Guo, Yanyi; Lin, Liwang (Fujian Provincial Hospital, Fujian 350001, Peop. Rep. China). *Zhongguo Xiaoduxue Zazhi*, 18(2), 115-117 (Chinese) 2001 *Zhongguo Xiaoduxue Zazhi Bianjibu*. CODEN: ZXZAFO. ISSN: 1001-7658. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 10 (Microbial, Algal, and Fungal Biochemistry) Section cross-reference(s): 61. The efficacy of electrolyzed oxidizing water (EOW) with high redox potential (1185-1189 mV, pH 2.31-2.39, available Cl 53-60 mg/L) in disinfecting gastroscop was studied by suspension quant. bactericidal test and gastroscop immersion disinfection test. The killing rate of spores of *Bacillus subtilis* var. *niger* in suspension exposed to EOW stock soln. for 10 min was 100%. HBsAg antigenicity was completely destroyed by EOW stock soln. in 2 min. The bacteria on surface of gastroscop were completely killed by continuous immersion of 8 gastroscop in EOW stock for 1 min, but not by subsequent immersion. The results showed that one barrel of EOW stock soln. may be suitable for disinfection of 4-5 gastroscopes.

135:65503

Method for deodorizing and cleaning waste gas or smoke using electrolyzed water. Nakamura, Shinichi; Fukuzuka, Kunihiro (Omega Co., Ltd., Japan). *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2001179046 A2* 3 Jul 2001, 13 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: B01D053-38. ICS: B01D053-77; A61L009-01; B01D053-14; B01D053-34; C02F001-46. APPLICATION: JP 1999-371314 27 Dec 1999. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 59 (Air Pollution and Industrial Hygiene) Section cross-reference(s): 61, 72 . The malodorous and harmful substances are removed from a waste gas or smoke by bringing the waste gas or smoke into contact with an absorption tower contg. electrolyzed water produced by electrolyzing water contg. a chloride or a bromide by an electrolysis app. The method is for oxidizing and decomp. malodorous and harmful substances in waste gas or smoke from a chem. app., wastewater treatment facilities, waste treatment processes, etc., with hypobromous acid and hypochlorous acid with high oxidn. activity in the electrolyzed water.

134:202583

Electrolyzed and natural reduced water exhibit insulin-like activity on glucose uptake into muscle cells and adipocytes. Oda, M.; Kusumoto, K.; Teruya, K.; Hara, T.; Maki, T.; Kabayama, S.; Katakura, Y.; Otsubo, K.; Morisawa, S.; Hayashi, H.; Ishii, Y.; Shirahata, S. (Graduate School of Genetic Resources Technology, Kyushu University, Fukuoka, Japan). *Anim. Cell Technol.: Prod. Cells, Cells Prod., Proc. ESACT Meet.*, 16th, 425-427. Edited by: Bernard,

Alain. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Neth. (English) 1999. CODEN: 69ANWU. DOCUMENT TYPE: Conference CA Section: 1(Pharmacology). In the type 2 diabetes, it has become clear that reactive O species (ROS) cause redn. of glucose uptake by inhibiting the insulin-signaling pathway in muscle cells and adipocytes. The authors demonstrated that electrolyzed-reduced water (ERW) scavenges ROS and protects DNA from oxidative damage. Here the authors found that ERW scavenges ROS in insulin-responsive L6 myotubes and mouse 3T3/L1 adipocytes. Uptake of 1-deoxy-D-glucose (2-DOG) into both L6 cells and 3T3/L1 cells was stimulated by ERW in the presence or absence of insulin. This insulin-like activity of ERW was mediated by the activation of PI-3 kinase, resulting in stimulation of translocation of glucose transporter GLUT4 from microsome to plasma membrane. These results suggest that ERW may be useful to improve insulin-independent type 2 diabetes.

135:355166

Experimental observation on some properties of electrolyzed oxidizing water with high redox potential. Li, Aibin; Chen, Guiqiu; Zhu, Yingkai; Huang, Wei; Zhou, Songhang (Hunan Provincial Sanitary and Anti- epidemic Station, Changsha 410005, Peop. Rep. China). Zhongguo Xiaoduxue Zazhi, 18(2), 75-78 (Chinese) 2001 Zhongguo Xiaoduxue Zazhi Bianjibu. CODEN: ZXZAFO. ISSN: 1001-7658. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 10 (Microbial, Algal, and Fungal Biochemistry) Section cross-reference(s): 59. The germicidal efficacy, stability, and corrosiveness of electrolyzed oxidizing water (EOW for short) with redox potential of 1153-1165 mV, pH 2.21-2.27, and available chlorine content of 50.29-58.24 mg L-1 were studied by carrier immersion quant. germicidal test. The killing rate of *Candida albicans* on cloth strip exposed to EOW stock soln. for 3 min and 20 min was 99.91% and 100%, resp. The germicidal efficacy of EOW was affected by addn. of calf serum. After storing in an opaque plastic bottle in a incubator at 54° for 14 d, its ORP value was decreased to 1147-1150 mV, and its pH value was increased to 2.35-2.42. The EOW had no corrosive effect on stainless steel, slightly corrosive effect on copper, and moderately corrosive effect on carbon steel and aluminum.

135:206903

Control of plant diseases using acidic electrolyzed waters with different pH. Omori, Toshihiro; Oka, Takumi; Kuda, Toru; Ishigooka, Hiroshi; Arata, Yoji (Kinosui Kenkyusho K. K., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2001247420 A2 11 Sep 2001, 5 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: A01N059-08. ICS: A01N025-02. APPLICATION: JP 2000-64070 8 Mar 2000. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 5 (Agrochemical Bioregulators). Rice seeds infected with *Pseudomonas glumae* were soaked in electrolyzed water showing pH 2.0 and Cl concn. 200 ppm and treated with electrolyzed water showing pH 5.0 and Cl concn. 200 ppm for germination stimulation to result in 99% germination and 3% severity, vs. 87% germination and 54% severity, for control.

135:97096

Sporicidal efficacy of electrolyzed oxidizing water with high redox potential. Li, Jingqin; Ding, Jinhua; Shen, Peng (Tianjin Municipal Sanitary and Disease-Prevention Center, Tianjin 300011, Peop. Rep. China). Zhongguo Xiaoduxue Zazhi, 18(1), 37-38 (Chinese) 2001 Zhongguo Xiaoduxue Zazhi Bianjibu. CODEN: ZXZAFO. ISSN: 1001-7658. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 61 (Water) Section cross-reference(s): 10. The sporicidal efficacy of electrolyzed oxidizing water (EOW) with high redox potential (ORP) was studied by suspension quant. bactericidal test. The killing rate of *Bacillus subtilis* var. *niger* spores in suspension was

100% by EOW with redox potential of 1,260 mV at pH 2.25 for 10 min. The killing rate decreased with a decrease of EOW ORP and an increase of pH.

135:9957

Experimental observation on destruction of HBsAg antigenicity by acidic water with high redox potential. Jin, Weisheng; Han, Chengwu; Zhang, Jing; Gao, Zheping; Yin, Weiling (China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, Peop. Rep. China). *Zhongguo Xiaoduxue Zazhi*, 17(3), 163-165 (Chinese) 2000 *Zhongguo Xiaoduxue Zazhi Bianjibu*. CODEN: ZXZAFO. ISSN: 1001-7658. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 63 (Pharmaceuticals). The destroying effect of acidic water (electrolyzed oxidizing water, EOW) with high redox potential on HBsAg antigenicity was studied by suspension test method, and the relationship between this effect and the acidity was studied. HBsAg antigenicity was destroyed by using EOW for 10 s, but not by using hydrochloric acid soln. with the same pH as EOW (pH 2.7) for 60 s.

134:352397

Use of weakly acidic electrolyzed water in sanitation of milking barn. Nakamura, Teiichi; Suzuki, Kiyoshi; Doi, Toyohiko; Nakamura, Masato (Food Res. & Dev. Lab., Morinaga Milk Ind. Co., Ltd., Japan). *Miruku Saiensu*, 49(3), 189-193 (Japanese) 2000 *Nippon Rakuno Kagakkai*. CODEN: MISAFD. ISSN: 1343-0289. DOCUMENT TYPE: Journal; General Review CA Section: 17 (Food and Feed Chemistry). A review with 5 refs. on the manuf. of weakly acidic electrolyzed water (WAEW) (pH 6.0) contg. 20 ppm available Cl with Purester, a water electrolysis app. and application of WAEW to hygienic washing for milking equipment. From the results of bacterial count in the pipe lines and milk quantity meter and viable cell count of bulk milk, WAEW is found to be superior to NaOCl soln. contg. 180 ppm available Cl for hygienic washing of milking equipment.

135:4587

Utilization of electrolyzed acidic water in microbial control and processing for fresh foods. Isobe, Sreiichiro (Department of Food Engineering, Food Research Institute, Japan). *Shokuhin Kogyo*, 43(22), 18-22 (Japanese) 2000 *Korin*. CODEN: SKGYAW. ISSN: 0559-8990. DOCUMENT TYPE: Journal; General Review CA Section: 17 (Food and Feed Chemistry). Section cross-reference(s): 19, 63. A review with 15 refs. on applications of electrolyzed acidic water in agriculture, food processing, and other surface treatment for control microbial.

135:348630

Disinfectant effects of hypochlorite produced by batch electrolytic system on fish pathogenic bacteria and virus. Kasai, Hisae; Watanabe, Ken-ichi; Yoshimizu, Mamoru (Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Minato, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan). *Suisan Zoshoku*, 49(2), 237-241 (Japanese) 2001 *Nippon Suisan Zoshoku Gakkai*. CODEN: SUZOAV. ISSN: 0371-4217. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 61 (Water) Section cross-reference(s): 10, 12, 60. The bactericidal and virucidal effects of hypochlorite produced by batch electrolytic system were examd. for fish pathogens. Sodium chloride solns., ranging from 0.5 to 3%, were electrolyzed and the concn. Of chlorine produced was measured. Almost same concn. of chlorine was produced when 1.0% or more NaCl soln. and seawater were electrolyzed. Fish pathogenic bacteria or virus was added to electrolyzed water and exposed to hypochlorite. More than 99% cells of *Vibrio anguillarum*, causative agent of fish vibriosis, were killed when the bacteria were exposed to 0.21 mg/l hypochlorite for 1 min. Yellow tail ascites virus (YAV) and

hirame rhabdovirus (HIRRV), the causative agents of viral ascites disease and rhabdovirus disease of marine fish, were inactivated more than 99% after treatment with 0.42 mg/l hypochlorite for 1 min. The no. of viable bacteria in the hatchery supply-seawater was reduced more than 99% when the water was treated with hypochlorite of 0.54 mg/l for 1 min. And more than 99% cells of viable bacteria in the waste-seawater were killed when the water was treated with hypochlorite of 0.64 mg/l for 5 min. The batch system developed in this study revealed remarkable bactericidal and virucidal effects, which were very similar to those in continuous flow-water system.

135:65933

System for treatment of aquaculture freshwater. Kido, Shigeki; Otsuka, Masahiro; Takeda, Shigeru (Japan Carlit Co., Ltd.; Hokuto Environmental System Co., Ltd., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2001178307 A2 3 Jul 2001, 6 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: A01K063-04. ICS: A01K063-00; C02F001-46; C02F001-50; C02F001-76. APPLICATION: JP 1999-370370 27 Dec 1999. DOCUMENT TYPE:

Patent CA Section: 61 (Water) Section cross-reference(s): 5. Trace amts. of salinity (Cl) in the aquaculture freshwater is selectively electrolyzed to give hypochlorous acid which is used for sterilizing or disinfecting (a part of) the water. Alternatively, the hypochlorous acid may be used for decompn. of such as macromols. or for oxidn. Of COD-elevating substances (both aiming at the improvement of transparency of the water). The method is simple and free from addnl. chems.

134:26514

Plant growth promoter preparation by electrolysis. Tojo, Hiromasa; Tojo, Tetsuro; Yoshimoto, Osamu; Yokomizo, Shinobu (Toyo Tanso Co., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2000344612 A2 12 Dec 2000, 6 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: A01N059-00. ICS: A01N061-00. APPLICATION: JP 2000-97802 30 Mar 2000. PRIORITY: JP 1999-89942 30 Mar 1999. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 5 (Agrochemical Bioregulators). Cytochrome C-reducing substance(s) (I) having neg. charge is prepd. by electrolysis of water with carbon electrode, drying, and solidifying. I can be purified from the electrolyzed water by liq. chromatog., ion-exchanging chromatog., and/or gel chromatog. Also, it can be pptd. from the electrolyzed water with alk. soln. such as nitrotetrazolium blue soln. I is useful for promotion the growth of plant.

135:112068

Microbicides comprising weakly-alkaline water produced by electrolyzing seawater and method to impart antimicrobial property to seawater. Mitsuyama, Junichi; Shibata, Hisanari; Oki, Shunichi (Toyama Chemical Co., Ltd.; Toyama Prefecture, Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2001198575 A2 24 Jul 2001, 4 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: C02F001-46. ICS: A01K063-04; A61L002-18; C02F001-50; A23B004-14. APPLICATION: JP 2000-330049 30 Oct 2000. PRIORITY: JP 1999-308654 29 Oct 1999. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 63 (Pharmaceuticals) Section cross-reference(s): 10, 61. Seawater such as deep seawater is electrolyzed to give weakly-alk. soln. having pH 7-10 from the cathode side. The soln. has strong disinfectant effect and is useful as a microbicide, freshness keeper, etc. Deep seawater was electrolyzed at 0.5 A for 25 min to give an aq. soln. having pH 8.84 and redox potential -361 mV. The soln. inhibited growth of *Staphylococcus aureus* FDA209P and *Escherichia coli* NIHJ.

133:94449

Effect of denture base resin and saliva protein on properties of strong acidic electrolyzed water. Part 1. Change of pH, oxidation-reduction potential and residual chlorine concentration. Kishii, Jiro; Yamauchi, Mutsuo; Nagasawa, Toru (Graduate School of Dentistry (Prosthodontics), Asahi University, Japan). Shika Zairyo, Kikai, 19(1), 27-33 (Japanese) 2000 Nippon Shika Riko Gakkai.

CODEN: SZKIDA. ISSN: 0286-5858. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 63 (Pharmaceuticals). If strong acidic electrolyzed (SAE) water is used to clean full denture, the denture base resin should not affect the properties of the SAE water. In this study the pH, oxidn.-redn. potential (ORP) and residual chlorine concn. of SAE water were detd. after dipping denture base resin into SAE water. Also, the pH, ORP and residual chlorine concn. of SAE water were measured by adding saliva protein into SAE water. The pH, ORP and residual chlorine concn. of SAE water were not changed by dipping denture base resin into SAE water. However, pH of SAE water was significantly increased, while ORP and residual chlorine concn. of SAE water were significantly decreased by adding saliva protein into SAE water. These results suggested that denture plaque control by SAE water is possible if the saliva, food debris and such materials are removed from the denture surface before applying SAE water to the denture.

132:35019

Solubility of steamed rice is dependent on electrolyzed water. Kobayashi, Kenji; Atarashiya, Kousuke; Hara, Yasuo; Horie, Shuji (Shimane Res. Dev. Lab., Hoshizaki Electr. Co., Ltd. 546, Oaza-jiryō, Kisuki-cho, Ohara-gun, Shimane 699-1393, Japan). Nippon Jozo Kyokai, 94(11), 926-932 (Japanese) 1999 Nippon Jozo Kyokai. CODEN: NJKYES. ISSN: 0914-7314. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 17 (Food and Feed Chemistry). Electrolyzed water obtained by electrolyzation of tap water was investigated as a means of controlling the soly. of steamed rice. The basic water obtained from the cathode side decelerated the soly. Of steamed rice. On the other hand, acidic water obtained from the anode side accelerated the soly. of steamed rice. It was confirmed that the effect caused the electrolyzed water was greatly influenced by the rice koji. Hence the extd. enzymes were examd. It was thought that in the case of basic water, the cause of the repression of steamed rice soly. was the decrease in the quantity of the acid protease extd. In the acidic water case, it was suggested that the cause of the acceleration of steamed rice soly. was the increase in the quantity of extd. α-amylase and acidic protease. In addn., the effect of electrolyzed water on acid protease activity was investigated. The results showed that acid protease was activated by acidic water and was inactivated by basic water.

133:94450

Effect of denture base resin and saliva protein on properties of strong acidic electrolyzed water, Part 2. Change of active oxygen species. Kishii, Jiro; Yamauchi, Mutsuo; Nagasawa, Toru (Graduate School of Dentistry (Prosthodontics, Asahi University, NMiyako-dori, Gifu 500-8309, Japan). Shika Zairyo, Kikai, 19(1), 34-38 (Japanese) 2000 Nippon Shika Riko Gakkai. CODEN: SZKIDA. ISSN: 0286-5858. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 63 (Pharmaceuticals) Using ESR spectroscopy, we investigated whether the reactive oxygen that bears the sterilization action of strong acidic electrolyzed water was influenced by resin. Also, we examd. whether the reactive oxygen species were affected by the saliva protein. The reactive oxygen species were examd. by spin trap method using 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) and ferrous sulfate. The characteristic spectrum pattern that is derived from DMPO-

OH from strong acidic electrolyzed water was obsd. DMPO-OH was not affected by dipping resin. DMPO-OH of the strong acidic electrolyzed water that contained the saliva protein showed a decrease in comparison with control and was in d. reliance nature. These results suggest that the effect of strong acidic electrolyzed water decreases if plaque and saliva that are adhering to the denture base are not washed mech. before strong acidic electrolyzed water was used for denture plaque control.

132:307549

Effect of organic substances on the residual chlorine contained in the strong acidic electrolyzed water. Tosa, Noriteru; Yamasaki, Yukikazu (Hamada Branch, Inst. of Ind. Sci. and Technol. Shimane Prefect. 388-3, Shimokou-cho, Hamada-shi, Shimane 697-0006, Japan). Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 47(4), 287-295 (Japanese) 2000 Nippon Shokuhin Kagaku Kogakkai. CODEN: NSKKEF. ISSN: 1341-027X. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 17 (Food and Feed Chemistry) Section cross-reference(s): 61. Strong acidic electrolyzed water (SAW) has unique characteristics such as high pos. oxidn.-redn., strong acidity, high concn. of dissolved O and strong bactericidal activity. The bactericidal effect is considered to be due to hypochlorous acid (HOCl) and residual Cl contained in SAW. It is well-known that the residual Cl in sodium hypochlorite soln. (NaOCl) decreases when mixed with org. substances. But a detailed anal. of the reaction of SAW with org. substances has not been done. In this research, we examd. the effect of org. substances contained in cabbage juice on SAW, comparing SAW and NaOCl soln. As a result, it was suggested that 85% of the residual Cl in NaOCl and SAW was consumed by nitrogenous compds. and 15% of it was consumed by other substances such as kinds of polyphenol and L-ascorbic acid. Then we measured the rates of concn. of free and combined Cl when the residual Cl in SAW and NaOCl reacted with NH₃. These results indicate that the characteristics of SAW are mainly due to the residual Cl and strong acidity.

133:205076

Enzyme activation via dissolving it in electrolyzed water. Kobayashi, Kenji; Hara, Yasuo; Niiya, Kosuke; Takinami, Koichi; Izumi, Yoshikazu (Hoshizaki Electric Co., Ltd., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2000245453 A2 12 Sep 2000, 8 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: C12N009-00. ICS: C02F001-46; C12N009-20; C12N009-32; C12N009-62. APPLICATION: JP 1999-56985 4 Mar 1999. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 9 (Biochemical Methods) Section cross-reference(s): 7. A method of enzyme activation via dissolving it in electrolyzed water is presented. Electrolyzed water is obtained by electrolysis of dild. saline soln. a-Amylase is activated in electrolyzed alk. water. Acidic protease and lipase are activated in electrolyzed acidic water.

132:98184

Blood membranes and manufacture thereof. Uesumi, Toshiji; Yoshida, Hajime (Asahi Medical Co., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2000024104 A2 25 Jan 2000, 5 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: A61M001-22. ICS: B01D069-00. APPLICATION: JP 1998-207075 8 Jul 1998. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 63 (Pharmaceuticals). The invention relates to a blood membrane suitable for use for hemodialysis, blood filtration, and sepn., etc., wherein the surface of the membrane obtains a reducibility after treatment of g-ray sterilization by using water having an oxidn.-redn. potential of £ -500 mV, e.g. electrolyzed water and oxygen-satd. water, thereby preventing unwanted effect on blood components due to oxidizers in the membrane formed by the g-ray irradiation.

132:69386

Wet tissues and cosmetic sheet packs containing chlorides in which discolorations are prevented. Ohnishi, Shunji (Myojo Sansho K. K., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2000014587 A2 18 Jan 2000, 3 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: A47K007-00. ICS: A47K010-20; A61K007-50. APPLICATION: JP 1998-219544 29 Jun 1998. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 63 (Pharmaceuticals) Section cross-reference(s): 62. The invention relates to a wet tissue or a cosmetic sheet pack contg. A chloride in the compn., e.g. NaCl, KCl, MgCl₂, marine water, natural salt, seaweed, charcoal, mineral spring salt, electrolyzed acidic soln., etc., wherein the compn. for the wet tissue or cosmetic sheet pack further contains a corrosion preventing agent, e.g. sodium hydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate, trisodium phosphate, potassium dihydrogen phosphate, dipotassium hydrogen phosphate, tripotassium phosphate, ammonium hydrogen phosphate, and ammonium dihydrogen phosphate, etc., 0.05-1 %, so that discoloration of the wet tissue or cosmetic sheet pack due to the chloride is prevented. A wet tissue was prepd. with a compn. contg. Propylene glycol 6, dried marine water 0.8, sodium monohydrogen phosphate 0.2, sodium dihydrogen phosphate 0.3, Me paraben 0.16, Et paraben 0.12, Pr paraben 0.02, and water q.s. to 100 %.

131:161680

Cleaning and sterilization of medical goods with electrolyzed water containing hypohalous acids and apparatus therefor. Nakamura, Shinichi; Fukuzuka, Kunihiko; Fujii, Hiromi (T.R.P. K. K., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 11226092 A2 24 Aug 1999 Heisei, 15 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: A61L002-02. ICS: C02F001-46. APPLICATION: JP 1998-46239 12 Feb 1998. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 63 (Pharmaceuticals) Section cross-reference(s): 10. Used medical goods are cleaned and sterilizes by treatment with electrolyzed water contg. hypohalous acids, which is prepd. By dissolving bromides or bromides and the other halides in H₂O and directly electrolyzing the soln., while keeping the pH at ³6. App. for the method is also described and may have an ultrasonic generator and/or a vibrator. The method shows high sterilizing effects without corroding metal parts of medical goods. Sterilization effect of the system using an aq. NaCl soln. and an aq. NaBr soln. against *Cryptosporidium* oocysts was also examd.

131:155728

Bactericidal and virucidal mechanisms of strongly acidic electrolyzed water. Shimizu, Yoshinobu; Iwata, Munetaka (Fac. Dent., Tohoku Univ., Japan). Infect. Control, 8(7), 756-759 (Japanese) 1999 Medika Shuppan. CODEN: INCOFY. ISSN: 0919-1011. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 10 (Microbial, Algal, and Fungal Biochemistry) Strongly acidic water shows bactericidal and virucidal effects. Strongly acidic water was obtained by electrolyzation of water contg. ~0.05% salt. Effects of strongly acidic water on collagenase, protease, and hyaluronidase produced by *S. aureus*, and on virus infectious value of some virus were studied. All of enzyme activities and virus infectious value were disappeared by treatment with strongly acidic water. These effects are caused by prodn. of hypochlorous acid. Bactericidal and virucidal mechanism of strongly acidic water is discussed.

130:213418

Electrolytic water suitable for washing face, its production, and apparatus therefor. Omochi, Teruyuki; Tanaka, Yoshinori (Matsushita Electric Works, Ltd., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 11060429 A2 2 Mar 1999 Heisei, 8 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: A61K007-00. ICS: A61K031-19; C02F001-46; C02F001-70. APPLICATION: JP 97-229942 26 Aug 1997. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 61 (Water) Section cross-reference(s): 1, 62, 63. The water is produced by electrolyzing aq. solns. contg. 3×10^{-4} mol/L org. acids, 3×10^{-3} mol/L org. acid salts, and reducing agents capable of removing free Cl to lower the oxidn.-redn. potential. The water has skin-moisturizing effect. Citric acid 5×10^{-4} , Na citrate 1.6×10^{-3} mol/L, and Na ascorbate 10^{-4} mol/L were added to tap water and the soln. was electrolyzed to give water with pH 5.5 and free Cl concn. 0 ppm. The water was used by atopic dermatitis patients to diminish skin symptoms.

130:248353

Composition for plant nutrition and increase of plant nutritional value. Kawai, Hiroshi (Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 11075549 A2 23 Mar 1999 Heisei, 9 pp (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: A01G007-00. ICS: A01N025-02; A01N063-02; A01N041-12; A01N061-00. APPLICATION: JP 97-242880 8 Sep 1997. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 5 (Agrochemical Bioregulators). The compn. is prepd. from yeast ext., methionine, and/or activated O-contg. electrolyzed water. The compn. is useful for promotion of content of vitamin, carotenoid, inorg. element, and carbohydrate in plant.

126:176604

Electrolyzed water for sterilization with high electron activity and production of the water. Ogawa, Toshio; Hamazaki, Yoshikazu (Aiken Kogyo Kk, Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 09010768 A2 14 Jan 1997 Heisei, 7 pp. (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: C02F001-46. APPLICATION: JP 95-183456 26 Jun 1995. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 61 (Water) Section cross-reference(s): 5, 10 The water whose electron activity ($p_e = -\log[e^-]$) is 3×10^6 is produced by electrolysis of aq. solns. contg. little amts. of electrolytes, e.g. NaCl, KCl, and CaCl₂, by using electrolytic cells having semitransparent diaphragms. The water is used for disinfection for agricultural, medical, fishery, environmental, and cleaning application.

127:132132

Effect of electrolyzed strong acid aqueous solution on rat molars. Electron microscopic and contact microradiographic observations. Maki, Toshitsugu; Komatsu, Shigeki; Hata, Yoshiaki (Sch. Dent.

Niigata, Nippon Dent. Univ., Niigata 951, Japan). Shigaku, 85(1), 129-139 (Japanese) 1997 Nippon Shika Daigaku Shigakkai CODEN: SHIGAZ. ISSN: 0029-8484. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 4 (Toxicology) Section cross-reference(s): 63. When the electrolyzed strong acid aq. soln. (ESAAS) is applied to oral cavities in dentistry, its effect on teeth and other oral tissues has to be thoroughly investigated from the safety considerations. Therefore, the authors fed Sprague-Dawley rats with the ESAAS ad libitum and obsd. its effect on their teeth using both electron microscopy and contact radiog. The observation was performed on the molar of rats in a subacute test group, which was fed ESAAS ad libitum for 91 days, four short-term test groups, which were fed ESAAS ad libitum for 12, 24, 40 or 60 days, and a control group which was fed tap water for 91 days. The results of the investigation are shown below: After 24 days of ESAAS ad libitum feeding, the dissoln. of org. substances and demineralization of the surface

layers of the enamel and dentin became apparent. After 40 days of ESAAS ad libitum feeding, the attrition in the demineralized surface layer of the enamel and dentin caused by mastication became marked. After 91 days of ESAAS ad libitum feeding, there were marked morphol. changes in the molars caused by the demineralization and attrition. Although ESAAS has been known to have bactericidal and virucidal effects, it should also be recognized as an aq. soln. which dissolves org. substances and causes the demineralization of surface layer of the enamel and dentin. Therefore, it is necessary to carefully assess whether the clin. application of ESAAS is appropriate.

134:371792

Wound tissue cell proliferation promoter containing active oxygen-containing water. Yahagi, Naoki; Sumita, Nobuo (Coherent Technology Y. K., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2001139477 A2 22 May 2001, 6 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: A61K033-00. ICS: A61K009-08; A61P017-02; A61P043-00. APPLICATION: JP 1999-326993 17 Nov 1999. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 63 (Pharmaceuticals). The invention relates to a tissue cell proliferation promoter for use for treatment of wound, wherein the tissue cell proliferation promoter contains active oxygen-contg. water esp. obtained by electrolysis of halogen-contg. soln.

137:342159

Skin treatment with a water soluble antibiotic dissolved in an electrolyzed water. Heesch, Gary V. (USA). U.S. Pat. Appl. Publ. US 2002165220 A1 7 Nov 2002, 13 pp., Cont. of U.S. Ser. No. 585,457, abandoned. (English). (United States of America). CODEN: USXXCO. CLASS: ICM: A61K031-407. ICS: A61K033-00. NCL: 514210090. APPLICATION: US 2001-858261 15 May 2001. PRIORITY: US 1992-944051 11 Sep 1992; US 1993-153611 17 Nov 1993; US 1996-585457 16 Jan 1996. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 63 (Pharmaceuticals) Section cross-reference(s): 1 A method for treating a skin condition, such as acne, eczema, and psoriasis, by intimately combining a water sol. antibiotic with the keratin layer of the outermost layer of the cleansed epidermis is described. The antibiotic is dissolved in the alk. fraction of an electrolyzed water. The soln. is characterized by the absence of hydrolysis products, turbidity, and loss of potency of the antibiotic. The aq. soln. is applied to the treatment area where the water is absorbed

by the keratin and the antibiotic is carried into intimate contact with the keratin after which the water is evapd. leaving the antibiotic dispersed across the treatment area.

136:347274

Hydrogen concentration in water from an Alkali-Ion-Water electrolyzer having a platinum-electroplated titanium electrode. Kikuchi, Kenji; Takeda, Hiroko; Rabolt, Beatrice; Okaya, Takuji; Ogumi, Zempachi; Saihara, Yasuhiro; Noguchi, Hiroyuki (Department of Materials Science, University of Shiga Prefecture, Hikone 522-8533, Japan). Journal of Applied Electrochemistry, 31(12), 1301-1306(English) 2001 Kluwer Academic Publishers. CODEN: JAELBJ. ISSN: 0021-891X. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 72 (Electrochemistry) Section cross-reference(s): 48, 65, 66 The supersatd. concn. of hydrogen in electrolyzed water obtained from a flow-type electrolytic cell was studied under various

electrolysis conditions. The degree of supersatn. decreases as the soln. supply rate to the cell increased. The ratio of obsd. hydrogen concn. to the theor. hydrogen concn. obtained from the electrochem. equiv., as calcd. from the transfer of charge in the cell, increases with the soln. supplyrate. The concn. of hydrogen in soln. has a max. at a c.d. of $\sim 0.3 \text{ A dm}^{-2}$. This max. is independent of the flow rate, indicating that the hydrogen concn. is related to both the diffusion of dissolved hydrogen from the electrode surface to the bulk soln. and hydrogen bubble growth.

136:390701

Water electrolysis apparatus for producing disinfected and neutralized water. Shimizu, Yasuhiko; Ikegami, Kazuo; Hirota, Tatsuya (Sanyo Electric Co., Ltd., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2002153879 A2 28 May 2002, 11 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: C02F001-46. ICS: A47K003-00; C02F001-50; E03B011-00.

APPLICATION: JP 2000-354390 21 Nov 2000. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 61 (Water) Section cross-reference(s): 72 The water electrolysis app. comprises a water tank for storing water; an electrolysis tank for producing Cl for disinfection and sterilization by water electrolysis; a water circulation line for introducing water from the water tank to the electrolysis tank and turning electrolyzed water back to the water tank; a Cl- concn. control means installed in the upstream side of the electrolysis tank for controlling Cl- concn. By supplying a Cl--contg. electrolysis promoting agent; and a neutralization means for adding a pH adjusting agent (e.g., sulfates and phosphates) to the water flowing in the circulation line to turn neutralized water back to the water tank. Disinfected and neutralized water can stably and easily be produced without requiring troublesome agent addn. control. The app. is useful for bath water and pool water treatment.

136:107148

Electrolytic water production apparatus for supplying water with disinfecting capability. Saruhashi, Makoto; Sasaki, Masatomi (Terumo Corp., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2002018441 A2 22 Jan 2002, 8 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: C02F001-46. ICS: A61C019-00; A61L002-02; A61L002-18. APPLICATION: JP 2000-202891 4 Jul 2000. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 61 (Water) Section cross-reference(s): 72 The electrolytic water prodn. app. comprises (1) a water storage part for storing water to be electrolyzed; (2) an electrolytic unit for electrolyzing the water stored in the storage part 1 to produce electrolytic water; (3) an electrolytic water storage part for storing the obtained electrolytic water; (4) a nozzle for jetting the obtained electrolytic water; (5) a 1st water channel for communicating the storage part 1 and the storage part 3; (6) a 2nd water channel for communicating the storage part 3 and the nozzle 4; (7) a control means for controlling the water flow in the 1st water channel; and (8) a control means for controlling the electrolytic water flow in the 2nd water channel: and the app. is so composed as to carry out electrolytic water prodn. simultaneously with water flow to the electrolytic unit. Water having a stable pH, an effectively high Cl concn. and a highly disinfecting capability can easily be produced even if the load on a water supply pump is changed.

137:5275

Sterilization effect and influence on food surface by acidic electrolyzed water treatment. Yoshida, Kyoichiro; Lim, Kyung-il; Chung, Hee-chul; Uemura, Kunihiro; Isobe, Seiichiro; Suzuki, Tetsuya (Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate 041 8611, Japan). *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 48(11), 827-834 (Japanese) 2001 Nippon Shokuhin Kagaku Kogakkai. CODEN: NSKKEF. ISSN: 1341-027X. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 17 (Food and Feed Chemistry) Recently, several reports about sterilization effect of electrolyzed water have been published. The electrolyzed water is expected as one of attractive application for sanitation of fresh food, however, to install this electrolyzed water, the authors have to clear the potential of the microorganism control for real food. In this paper, the authors try to reveal the mechanism of the microorganism control, and also try to check the food quality change during the treatment. Therefore, to evaluate the effect of the electrolyzed water, authors examd. The several test for making sterilization mechanism clear and obsd. microorganism behavior on food surface. At first, for the purpose of making sterilization effects clear in vitro condition, authors carried out microorganism test with several injection ratio and no. Then, authors studied the effects of catalase on the enumeration of stressed *Escherichia coli* cells after acidic electrolyzed water treatment. Moreover, they studied sterilization effect of acidic electrolyzed water for *E. coli* on an agar block on the assumption as one of food model. In addn., they studied sterilization effects for sliced raw tuna as one sample of food surface treatment. The change in the quality of food surface was obsd. by scanning electron microscope, color meter and so on. Sterilization effects are dependent on the condition of injection ratio and mixing nos. These results suggest that it is important to keep available chlorine concn. for keeping the potential to the microorganisms' control. The increasing of *E. coli* no. with the addn. of catalase was suggested that the weak concn. of electrolyzed water gave the injured microbes. The observation of cultivated *E. coli* behavior on agar block showed the microorganism behavior. Acidic electrolyzed water sterilizes microorganisms on sliced raw tuna, however, after treatment, the color change of surface of tuna and the protein denaturation were obsd. These results suggest that when the electrolyzed water treatment is applied to control, the microorganisms on the surface, the effect against food surface, must be considered.

137:92912

Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. Park, Hoon; Hung, Yen-Con; Brackett, Robert E. (Department of Food Science and Technology, College of Agricultural and Environmental Sciences, University of Georgia, Griffin, GA 30223-1797, USA). *International Journal of Food Microbiology*, 72(1-2), 77-83 (English) 2002 Elsevier Science Ltd. CODEN: IJFMDD. ISSN: 0168-1605. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 17 (Food and Feed Chemistry) The effectiveness of electrolyzed (EO) water for killing *Campylobacter jejuni* on poultry was evaluated. Complete inactivation of *C. jejuni* in pure culture occurred within 10 s after exposure to EO or chlorinated water, both of which contained 50 mg/l of residual chlorine.

A strong bactericidal activity was also obsd. on the dild. EO water (contg. 25 mg/l of residual chlorine) and the mean population of *C. jejuni* was reduced to less than 10 CFU/mL (detected only by enrichment for 48 h) after 10-s treatment. The dild. Chlorine water (25mg/l residual chlorine) was less effective than the dild. EO water for inactivation of *C. jejuni*. EO water was further evaluated for its effectiveness in reducing *C. jejuni* on chicken during washing. EO water

treatment was equally effective as chlorinated water and both achieved redn. of *C. jejuni* by about 3 log₁₀ CFU/g on chicken, whereas deionized water (control) treatment resulted in only 1 log₁₀ CFU/g redn. No viable cells of *C. jejuni* were recovered in EO and chlorinated water after washing treatment, whereas high populations of *C. jejuni* (4 log₁₀ CFU/mL) were recovered in the wash soln. after the control treatment. Our study demonstrated that EO water was very effective not only in reducing the populations of *C. jejuni* on chicken, but also could prevent cross-contamination of processing environments.

137:246749

Study on sterilization of electrolyzed water on soybean. Li, Bo; Li, Lite; Zhao, Chaohui; Yang, Suzhen (Food College, China Agricultural University, Beijing 100083, Peop. Rep. China). Shipin Gongye Keji, 23(1), 12-16 (Chinese) 2002 Shipin Gongye Keji Bianjibu. CODEN: SGOKE6. ISSN: 1002-0306. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 17 (Food and Feed Chemistry) The sterilization of electrolyzed water on soybean was studied. And the change of the effective elements of electrolyzed water during soaking was also systemically studied too. The results showed that compared with O₃ or NaClO disinfectants, the sterilization effect on soybean cleaned or soaked with the acid water of electrolyzed water was the best. The total no. of microorganism in soybean could be reduced by 2-3 log units. At the end of soaking, the pH value of acid water and mixed water approached neutral, and the ACC was close to 0. The influence of mixed water on the gel strength of tofu was very small. At normal temp., the sterilization of mixed water on spore of *B.firmus* was very effective. But 5% acid water had no sterilization effect on *B. firmus* in soybean milk. When sterilizing on *B. firmus* in soybean milk at 85°, the addn. of acid water could decrease heat resistance.

136:24899

Electrolyzed water of anode side and process for production thereof. Kokichi, Hanaoka (Mikuni Corporation; Hanaoka, Kohkichi, Japan). Eur. Pat. Appl. EP 1162176 A1 12 Dec 2001, 25 pp. DESIGNATED STATES: R: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE, MC, PT, IE, SI, LT, LV, FI, RO. (English). (European Patent Organization). CODEN: EPXXDW. CLASS: ICM: C02F001-461. ICS: A61K031-00. APPLICATION: EP 2001-250198 1 Jun 2001. PRIORITY: JP 2000-172538 8 Jun 2000. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 61 (Water) According to the invention, there is disclosed an electrolyzed water of anode side contg. less than 0.1 mM of a water-sol. inorg. salt, 1 to 50 mM of ascorbic acid and 8 to 15 mg/l of dissolved oxygen and having a dismutation activity for superoxide radicals; and a process for producing an electrolyzed water of anode side having a dismutation activity for superoxide radicals, which comprises electrolyzing an aq. electrolytic soln. contg. less than 0.1 mM of a water-sol. inorg. salt and 1 to 50 mM of ascorbic acid and then taking out the electrolyzed water of anode side generated.

137:200647

Electrolyzed deep-sea water for improving constipation. Kakuta, Sahoe; Oki, Shunichi; Komai, Tamotsu (Toyama Chemical Co., Ltd.; Toyama Prefecture, Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2002262829 A2 17 Sep 2002, 4 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: A23L001-30. ICS: A23L001-304; A23L002-52; A23L002-38; A61K031-047; A61K033-00; A61P001-10. APPLICATION: JP 2001-64454 8 Mar 2001.

DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 17 (Food and Feed Chemistry) Section cross-reference(s): 1 The weak alk. electrolyzed deep-sea water, pH 7-10, with the addn. of sugar alc. such as xylitol is useful for improvement of constipation. The weak alk. electrolyzed deep-sea water is obtained from the anode in electrolysis of the deep-sea water. It is useful for manufg. health food for alleviating and improvement of constipation.

136:262123

Cleaning of alumina fouled with bovine serum albumin by the combined use of gaseous ozone and alkaline electrolyzed water. Takehara, Atsuhiko; Urano, Hiromi; Fukuzaki, Satoshi (Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, Okayama 701-1296, Japan). *Biocontrol Science*, 6(2), 103-106 (English) 2001 Society for Antibacterial and Antifungal Agents, Japan. CODEN: BISCFY. ISSN: 1342-4815. DOCUMENT TYPE: Journal CA Section: 17 (Food and Feed Chemistry) Alumina (Al₂O₃) particles fouled with bovine serum albumin (BSA) were cleaned with alk. electrolyzed water and NaOH solns. of different pHs. The efficiency and rate of BSA desorption during batchwise and continuous cleaning with alk. electrolyzed water depended on the soln. pH, i.e., the hydroxide ion concn. Pretreatment of BSA-fouled Al₂O₃ with 0.3% (vol./vol.) gaseous ozone markedly facilitated BSA desorption during subsequent cleaning with alk. electrolyzed water, depending on the length of pretreatment. The results suggest that the efficiency of cleaning with gaseous ozone and alk. electrolyzed water (pH 11.7) in combination is comparable to that of cleaning with high-pH NaOH solns. (pH >13.0) alone.

137:252624

Reducing electrolyzed water and method for producing same. Satoh, Fumitake; Han, Shouka; Yanagihara, Tomoyuki; Naitou, Tatsuya; Koizumi, Takemi (Japan). U.S. Pat. Appl. Publ. US 2002134691 A1 26 Sep 2002,8 pp. (English). (United States of America). CODEN: USXXCO. CLASS: ICM: C02F001-461. ICS: C22B034-30; C01G037-00; C01G039-00; C01G041-00; C25B001-00. NCL: 205742000. APPLICATION: US 1998-58289 10 Apr 1998. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 61 (Water) Section cross-reference(s): 63 The invention provides reducing electrolyzed water which has a pH of 3 to 12 and an oxidn.-redn. potential of up to -200 mV, preferably a pH of 5 to 11 and an oxidn.-redn. potential of up to -500 mV, and in which the common logarithm of the product of the hydrogen ion concn. [H⁺] and the electron concn. [e⁻] is at least -4.5, preferably at least 0. The reducing electrolyzed water is used as potable water, agricultural fertilizers, drip solns. and other injections, dialysis solns. and face lotion, and particularly shows significant medical effects.

137:171467

System and method to clean and disinfect carpets, fabrics, and hard surfaces using electrolyzed alkaline water produced from a solution of NaCl. Harkins, Gene (USA). U.S. Pat. Appl. Publ. US 2002112314 A1 22 Aug 2002,8 pp. (English). (United States of America). CODEN: USXXCO. CLASS: ICM: A47L007-00. ICS: A61L009-00. NCL: 015321000. APPLICATION: US 2001-947121 5 Sep 2001. PRIORITY: US 2000 PV231017 8 Sep 2000. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 46 (Surface Active Agents and Detergents) Section cross-reference(s): 61 A system and method for cleaning and disinfecting soft surfaces such as carpets, fabrics and the like and for cleaning and disinfecting hard surfaces such as plaster, drywall, concrete, linoleum, counter tops, wood, metal, tile and the like is disclosed. The system

and method uses electrolyzed alk. water produced by an electrolysis process using a std. electrolyte soln. of water and an electrolyte, wherein the electrolyte includes sodium chloride (NaCl) at a concn. between about 1% and 50%. In a preferred embodiment about a 20% concn. Of sodium chloride is used. The electrolyzed alk. water produced by this method is effective in cleaning and disinfecting both soft and hard surfaces.

136:107152

Water treatment apparatus for producing electrolytic water with disinfecting capability. Yamamoto, Kazuhiro; Hirota, Tatsuya; Inamoto, Yoshihiro; Kishi, Minoru; Nakanishi, Minoru; Kawamura, Tamotsu (Sanyo Electric Co., Ltd., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2002018442 A2 22 Jan 2002, 8 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: C02F001-46. ICS: C02F005-00. APPLICATION: JP 2000-205728 6 Jul 2000. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 61 (Water) Section cross-reference(s): 72

The water treatment app. is for producing electrolytic water for disinfection and comprises (1) an electrolytic unit connected to a water tank for electrolyzing water by applying elec. power to pairs of installed electrodes; (2) an electrolytic water channel for turning back the electrolytic water to the tank; and (3) a control means for controlling the power application to the electrodes and also controlling the electrolytic water flow. The control means is equipped with an electrode washing means by which electrodes are immersed in an electrode washing liq. for a prescribed period to be washed and descaled and the waste washing liq. is discharged on completion of washing. Water having a stable pH, an effectively high Cl concn. and a highly disinfecting capability can easily be produced without being accompanied with scale formation on electrodes.

137:134321

Clinical applications of electrolyzed-reduced water. Hayashi, Hidemitsu; Kawamura, Munenori (Water Institute, Neth.). Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, Proceedings of the Annual Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, 13th, Fukuoka and Karatsu, Japan, Nov. 16-21, 2000, Meeting Date 2000, 31-36. Edited by: Shirahata, Sanetaka; Teruya, Kiichiro; Katakura, Yoshinori. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Neth. ISBN: 1-4020-0271-8(English) 2002. CODEN: 69CWTU. DOCUMENT TYPE: Conference; General Review CA Section: 1(Pharmacology) A review. A very important and interesting paper was submitted by Happe in Jan. 1997. He says, the oldest life forms "Desulfoviorio gigas" 3.8 billion years old, had developed an enzyme "hydrogenase", to activate hydrogen, namely to split mol. hydrogen to at. hydrogen. Here, the question presented to us is why it was necessary for the oldest life forms to develop such an enzyme as hydrogenase. The answer for the question could be found in the paper submitted by Shirahata in May 1997. He says, the ideal scavenger for active oxygen should be "active hydrogen". Active hydrogen or at. hydrogen can be produced in reduced water near the cathode during electrolysis of water. Namely, the oldest life forms should have developed "hydrogenase" in order to obtain "active hydrogen" with which they could have succeeded in the fight against "active oxygen" which, otherwise, should have had exterminated them. We can say that the ideal countermeasure against active oxygen should be active hydrogen. Nothing can be better scavenger than active hydrogen as far as the principle of hydrogen bond is concerned. In Nov. 1995, I presented a hypothesis "Water Regulating Theory (Hayashi's Model) " in a US health magazine. It says that active oxygen could be scavenged or

reduced by at. hydrogen (H⁺ and e), which results in the prodn. of HO to give again a birthplace for every life form. Since May 1985 we have confirmed thousands of clin. improvements obtained solely by exchanging drinking as well as cooking water from tap water to reduced water.

137:283998

Cathodic water and its production by electrolysis of aqueous solutions containing ascorbyl glucosamine. Hanaoka, Kokichi (Mikuni K. K., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2002301476 A2 15 Oct 2002, 8 pp. (Japanese). (Japan). CODEN: JKXXAF. CLASS: ICM: C02F001-46. APPLICATION: JP 2001-110885 10 Apr 2001. DOCUMENT TYPE: Patent CA Section: 62 (Essential Oils and Cosmetics) Section cross-reference(s): 61

Aq. solns. contg. antioxidant ascorbyl glucosamine (AG) and <0.1M water-sol. inorg. salts are electrolyzed to produce cathodic water (e.g., alk. water) having oxidn.-redn. potential (ORP) lower than that of the raw solns. An aq. soln. contg. 0.3 wt.% AG was electrolyzed to give cathodic water having pH 4.0, ORP -89 mV, and dissolved O content 6.87 mg/L, which showed good skin-moisturizing, -lightening, and -conditioning effects.

137:200370

The history of acidic electrolyzed water. Hotta, Kunimoto (Natl. Inst. Infect. Dis., Japan). Gekkan Fudo Kemikaru, 18(7), 51-55 (Japanese) 2002 Shokuhin Kagaku Shinbunsha. CODEN: GFKEEX. ISSN: 0911-2286. DOCUMENT TYPE: Journal; General Review CA Section: 17 (Food and Feed Chemistry) Section cross-reference(s): 61 A review on the history of acidic electrolyzed water, which has get authorized as a food additive (disinfectant), from the scientific, technol., and social viewpoints.

137:165246

Suppressive effect of electrolyzed-reduced water on the growth of cancer cells and microorganisms. Komatsu, Takaaki; Kabayama, Shigeru; Hayashida, Akira; Nogami, Hirofuma; Teruya, Kiichiro; Katakura, Yoshinori; Otsubo, Kazumiti; Morisawa, Shinkatsu; Shirahata, Sanetaka (Graduate School of Genetic Resources Technology Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan). Animal Cell Technology: From Target to Market, Proceedings of the ESACT Meeting, 17th, Tyloesand, Sweden, June 10-14, 2001, 220-223. Edited by: Lindner-Olsson, Elisabeth; Chatzissavidou, Nathalie; Luellau, Elke. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Neth. ISBN: 1-4020-0264-5(English) 2001. CODEN: 69CRYK. DOCUMENT TYPE: Conference CA Section: 6 (General Biochemistry) Section cross-reference(s): 10, 14 We investigated the suppressive effect of electrolyzed reduced water (ERW) on the growth of not only various human cancer cells but also microorganisms such as gram-neg. Escherichia coli. ERW suppressed the growth of cancer cells, esp. in soft-agar culture. The suppressive effect of ERW on the growth of cancer cells depended upon cell types and malignancy of cancer cells and the prodn. Methods of ERW. We assumed that scavenging intracellular reactive oxygen species (ROS) by ERW resulted in impairing the tumor phenotypes such as rapid proliferation and anchorage-independent growth without affecting serious damage to normal cells. We also found that ERW exhibited weak microbicidal effect, esp. in low cell densities of microorganisms. It may contribute to prevent the rot of food or improve the intestinal microflora to prevent abnormal ferm.