



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROPIEDADES ANTIOXIDANTES *IN VITRO* DEL
MANGOSTÁN (*GARCINIA MANGOSTANA* L.)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA:
OCTAVIO GONZÁLEZ CUAHUTENCOS**



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. ROSARIO ADELAIDA MUÑOS CLARES.
Vocal	Prof. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ.
Secretario	Prof. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ.
1er. Suplente	Prof. SOBEÍDA SÁNCHEZ NIETO.
2º. Suplente	Prof. MARIA ELENA BRAVO GÓMEZ.

El desarrollo de este trabajo tuvo lugar en el laboratorio 209 de Bioquímica Clínica del Departamento de Biología. Edificio F de la Facultad de Química de la UNAM, México D. F.

Este trabajo de investigación recibió el apoyo del subprograma 127, de la Facultad de Química.

Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT No. IN207007 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM.

Dr. José Pedraza Chaverrí
Asesor de tema

M. en C. Omar Noel Medina Campos
Supervisor técnico

Octavio González Cuahutencos
Sustentante

Agradecimientos:

A mi FAMILIA que me acompañaron durante todo este tiempo, por su apoyo y por estar ahí siempre. ¡Gracias a ustedes "lo logré"!

Al Dr. José Pedraza y al maestro Omar Medina por comprenderme y tolerarme durante el desarrollo de este trabajo y sobre todo por brindarme una gran cantidad de conocimientos.

A la Dra. Silvia Guzmán por el apoyo técnico y académico prestado durante mi estancia en el laboratorio.

A todos los integrantes de mi comité tutural, por todas las aclaraciones y correcciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio del 209: por haber hecho agradable mi estancia gracias a: Pao, Sabinita, Silvia, Noemí, Marisol, Susana, Irasema, Carolina, Itzel, Sonia y Elvia. Sin ustedes me hubiera equivocado aún más y probablemente me hubiera desesperado.

A todos mis compañeros que me acompañaron durante toda la carrera y otros. Que forman parte de mi vida, fueron y son un gran apoyo.

A la UNAM que me dio muchas satisfacciones, alegrías y amarguras. Pero al final me dio mucho; "forjo parte de mi vida". *Una experiencia nunca es un fracaso, pues siempre viene a demostrar algo.* Thomas A. Edison.

Por supuesto a los maestros, que de alguna forma me dieron un poquito de ellos.

A la facultad de Química, por medio del subprograma 127 por el apoyo económico brindado, durante la realización de este trabajo.

A Dios, por permitirme soñar una vez más y despertar para comprender la dicha de estar vivo.

"El secreto de la genialidad es el de conservar el espíritu del niño hasta la vejez, lo cual quiere decir nunca perder el entusiasmo." Aldous Huxley

"La vida está compuesta de insignificancias; el año de instantes y las montañas de granos de arena. Por lo tanto no subestimes nada, por pequeño que te parezca." Lin Yutang

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	2
ABREVIATURAS	3
1. ANTECEDENTES	
1.1 <i>Garcinia mangostana</i> L.	4
1.2 Composición química	6
1.3 XanGo™	7
1.4 Oxígeno y la producción de especies reactivas de oxígeno	8
1.4.1 Producción de especies reactivas	9
1.4.2 Estrés oxidativo y nitrosativo	15
1.4.3 Dualidad fisiológica de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	15
1.4.4 Enfermedades asociadas a las ERO y ERN	16
1.4.5 Antioxidantes	17
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	
5.1 Preparación de las muestras	25
5.2 Determinación de la capacidad atrapadora de peroxinitrito <i>in vitro</i>	25
5.3 Determinación de la capacidad atrapadora de ácido hipocloroso <i>in vitro</i>	27
5.4 Determinación de la capacidad atrapadora de singulete de oxígeno <i>in vitro</i>	30
5.5 Determinación de la capacidad atrapadora de radical superóxido <i>in vitro</i>	32
5.6 Determinación de la capacidad atrapadora de peróxido de hidrógeno <i>in vitro</i>	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1 Análisis espectrofotométrico del extracto de la cáscara del mangostán y del XanGo™	36
6.2 Ácido hipocloroso	37
6.3 Peroxinitrito	41
6.4 Singulete de oxígeno	44
6.5 Radical superóxido	46
6.6 Peróxido de hidrógeno	49
7. RESUMEN DE RESULTADOS	50
8. CONCLUSIONES	52
9. PERSPECTIVAS	52
10. APÉNDICE	53
11. ANEXO	56
11.1 Preparación del extracto orgánico de <i>G. mangostana</i> L.	56
11.2 Fraccionamiento primario del extracto orgánico de <i>G. mangostana</i> L.	56
12. REFERENCIAS	61

RESUMEN

Los antioxidantes naturales han atraído la atención en la medicina preventiva ya que protegen a los diversos constituyentes celulares de la oxidación inducida por una excesiva producción de especies reactivas y/o una disminución del sistema antioxidante. La oxidación puede causar alteraciones estructurales principalmente en ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, lo que puede conducir al desarrollo de enfermedades crónico degenerativas en humanos como las cardiovasculares, las neurodegenerativas, diabetes y cáncer, entre otras.

Por otro lado, la cáscara de la fruta llamada mangostán (*Garcinia mangostana* L.), originaria del sudeste de Asia, se ha usado en la medicina tradicional de esa región desde hace muchos años. Se ha demostrado que tiene diversas propiedades como son: antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, y antiinflamatoria, entre otras. Sin embargo, respecto a la actividad antioxidante, hasta el momento no se han caracterizado las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que el mangostán puede atrapar. Tampoco se ha caracterizado la capacidad atrapadora de un jugo comercial de mangostán llamado XanGo™, compuesto de la fruta de la fruta entera del mangostán.

Por lo anterior, el propósito de este trabajo fue la evaluación de la capacidad antioxidante específica del extracto acuoso de la cáscara del mangostán y del XanGo™ para las especies reactivas: ácido hipocloroso, peróxido de hidrógeno, anión superóxido, singulete de oxígeno y anión peroxinitrito. Esta actividad antioxidante se expresó como CI_{50} (la concentración de muestra a la que se observa el 50% de atrapamiento de la especie reactiva de oxígeno o de nitrógeno). Los valores de CI_{50} se compararon con los obtenidos de diferentes antioxidantes de referencia.

El extracto acuoso del mangostán presentó actividad antioxidante ante las siguientes especies reactivas: anión superóxido ($CI_{50}=9.0\pm 0.75$ $\mu\text{g/mL}$), anión peroxinitrito ($CI_{50}=15.5\pm 0.8$ $\mu\text{g/mL}$), ácido hipocloroso ($CI_{50}=290\pm 18$ $\mu\text{g/mL}$) y singulete de oxígeno ($CI_{50}=1,046\pm 78$ $\mu\text{g/mL}$) mientras que el XanGo™ presentó actividad antioxidante ante el anión superóxido ($CI_{50}=45\pm 3$ $\mu\text{g/mL}$), anión peroxinitrito ($CI_{50}=147\pm 18$ $\mu\text{g/mL}$), y ácido hipocloroso ($CI_{50}=2,060\pm 74$ $\mu\text{g/mL}$). El extracto acuso del mangostán y el XanGo™ no presentaron capacidad atrapadora de peróxido de hidrógeno.

El extracto acuoso de la cáscara del mangostán y el jugo comercial tienen capacidad de atrapar diversas especies reactivas. La especie que es más eficazmente atrapada es el anión superóxido.

Lista de abreviaturas

AA	Porcentaje de atrapamiento
ANDG	Ácido nordihidroguaiarético
DHR	Dihidrorodamina 123
DMNA	N, N-Dimetil-4-nitrosoanilina
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CO ₃ ⁻	Radical carbonato
EE	Error estándar de la media
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Fig.	Figura
HOCl	Ácido hipocloroso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria media
KNO ₂	Nitrito de potasio
NaOH	Hidróxido de sodio
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NO [•]	Oxido nítrico
MnO ₂	Dióxido de manganeso
MPO	Mieloperoxidasa
ONOO ⁻	Anión peroxinitrio
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
¹ O ₂	Singulete de oxígeno
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio dibásico anhidro
NaOCl	Hipoclorito de sodio
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	Fosfato de sodio monobásico, monohidratado
*NO ₂	Radical dióxido de nitrógeno
MeOH	Metanol
RL	Radical libre
TCA	Ácido tricloroacético
T ₀	Tiempo a los cero minutos
T ₄₀	Tiempo a los 40 minutos
# cat.	Número de catálogo

1. Antecedentes

1.1 *Garcinia mangostana* L.

Características morfológicas

El mangostán (*Garcinia mangostana* Linn) es un miembro de la familia *Clusiaceae* y es un árbol tropical de lento crecimiento que alcanza una altura de 6 a 25 metros. Este árbol tiene frutos redondos con diámetro entre 6 y 7 centímetros de un color púrpura oscuro a rojizo, con cáscara (pericarpio) de 7 mm de espesor (Fig. 1). La porción comestible es blanca, suave, jugosa y con un sabor ligeramente ácido y dulce, tiene un agradable aroma y está dividida en varios segmentos (de cinco a ocho) (Jung *et al.*, 2006; Marcason, 2006).

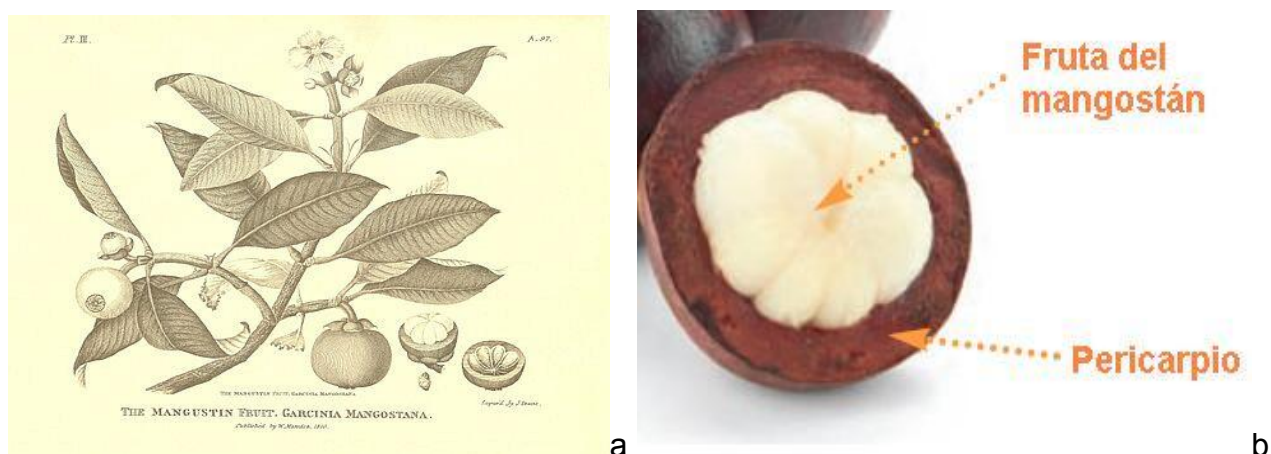


Fig. 1. a) rama del árbol del mangostán y b) fruto del mangostán.

Este árbol se distribuye predominantemente en Indonesia, Malasia, Sri Lanka, Myanmar, Filipinas y Tailandia. Los habitantes de estas áreas han utilizado el pericarpio del fruto de mangostán como parte de su medicina tradicional para tratar heridas e infecciones de la piel (Mahabusarakam, 1987; Pierce Salguero, 2003), la disentería amebiana (Garnet y Sturton, 1932; Chopra *et al.*, 1956; Sen *et al.*, 1980), el cólera, infecciones bacterianas (Moongkarndi *et al.*, 2004), inflamación crónica y diarrea (Balasubramanian y Rajagopalan, 1988).

Además se ha informado en diversas publicaciones que el mangostán presenta un amplio espectro de efectos biológicos: (a) antibacteriano: inhibe el crecimiento de *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* implicadas en el desarrollo de acné (Chomnawang *et al.*, 2005; Ee *et al.*, 2006), *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (Linuma *et al.*, 1996), *Mycobacterium tuberculosis* (Suksamrarn *et al.*, 2003), (b)

fungicida: inhibe el crecimiento de *Oxysporum vasinfectum*, *Alternaria tenuis*, y *Dreschlera oryzae* (Gopalakrishnan *et al.*, 1997); (c) antimalárico: inhibe a *Plasmodium falciparum* (Riscoe *et al.*, 2005), *Plasmodium berghei* (Fotie, *et al.* 2003); (d) antitumoral: disminuye la proliferación de células de cáncer de colon DLD-1 (Matsumoto *et al.*, 2005); (e) muestra actividad antiproliferativa contra líneas celulares SKBR3 de adenocarcinoma humano de mama; (f) antileucémico en líneas celulares Humanas HL60 (Matsumoto *et al.*, 2003); (g) antiulceroso (Moongkarndi *et al.*, 2004); (h) actúa como quelante de metales (Pinto *et al.*, 2005); (i) antiinflamatorio (Pinto *et al.*, 2005); (j) antitrombótico (Lin *et al.*, 1996); (k) es bloqueador de receptores de histamina y serotonina (Woo *et al.*, 2007) y (l) presenta propiedades antioxidantes, en la Tabla 1. Se resumen las propiedades antioxidantes encontradas del mangostán.

Tabla 1. Propiedades antioxidantes del pericarpio del mangostán.

Muestra	Propiedad	Referencia
Extracto acuoso y etanólico de la cáscara.	Atrapan radicales DPPH.	Weecharangsan <i>et al.</i> , 2006.
Extracto metanólico.	Inhibe lipoperoxidación y atrapa radical hidroxilo.	Garcia <i>et al.</i> , 2005.
Extracto etanólico.	Atrapa radicales ABTS y DPPH.	Leong y Sui, 2002.
Xantonas aislados del pericarpio.	Atrapan peroxinitrito.	Jung <i>et al.</i> , 2006.
α -mangostina y otros derivados.	Evitan la oxidación de LDL.	Williams <i>et al.</i> , 1995 ; Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2000

DPPH= (1,1-difenil-2-picrilhidracil) con naturaleza de un radical libre, ABTS = (Ácido 2, 2'- azino-bis-(-3-etilbenziltiazolina-6-sulfónico)) con naturaleza de un radical libre, LDL =lipoproteína de baja densidad.

1.2 Composición química

El mangostán contiene una variedad de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran xantonas preniladas y oxigenadas (Gopalakrishnan et al., 1980; Peres *et al.*, 2000), antocianinas glicosiladas, benzofenonas glicosiladas y derivados (Jinsart *et al.*, 1992, Huang *et al.*, 2001), peptinas, taninos, resinas y látex (Garrity *et al.*, 2004) los cuales se han aislado principalmente del pericarpio y en menor cantidad de la fruta completa, del tronco del árbol y de las hojas. Además en la semilla del mangostán se acumulan niveles significativos de ácidos grasos saturados, específicamente el 46% en peso corresponde a estearatos y el 8% a palmitatos (Hawkins y Kridl, 1998).

En las plantas las xantonas se derivan biosintéticamente de la combinación de la ruta del acetato-malonato y sikimato (Jinsart *et al.*, 1992) y constituyen los productos más estudiados del metabolismo secundario en el mangostán.

Dependiendo de la naturaleza de los sustituyentes dentro del anillo xantónico se subdividen en 5 grupos: xantonas oxigenadas simples, glicósidos de xantonas, xantonas preniladas y sus derivados, xantonolignoides y xantonas misceláneas (Pinto *et al.*, 2005).

Todas las xantonas presentan un núcleo base, conocido como 9*H*-xanten-9-ona o dibenzo γ pirona el cual es simétrico (Fig. 2) y está sustituido en diferentes posiciones dando lugar a una gran variedad de estructuras químicas (Tabla 2). Las xantonas aisladas del mangostán que más se han estudiado desde el punto de vista biológico son: la γ mangostina, la β mangostina y la α -mangostina (Vieira y Kijjoa, 2005; Pinto *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2003) (Tabla 2).

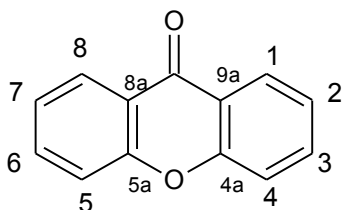
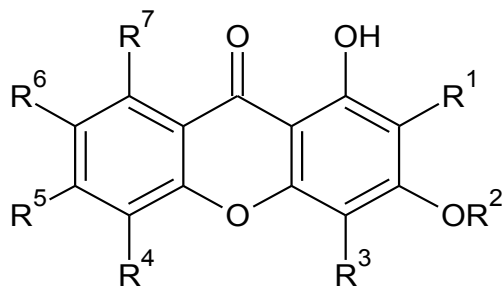
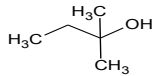
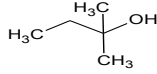
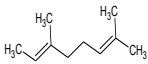


Fig. 2. Estructura del anillo base del núcleo xantónico, presenta dos grupos bencenos unido por una gama pirona, presentando sistemas conjugados, con una configuración plana y sin movimiento.

Tabla 2. Ejemplos de xantonas que han sido aisladas del pericarpio del mangostán.



Compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
β-mangostina	Pre	CH ₃	H	H	OH	OH	Pre
α-mangostina	Pre	H	H	H	OH	OCH ₃	Pre
γ-mangostina	Pre	H	H	H	OH	H	Pre
Garcinona E	Pre	H	H	pre	OH	H	Pre
Garcinona D	Pre	H	H	H	OH	CH ₃	
Garcinona C	Pre	H	H	H	OH	H	
8-Desoxygartanina	Pre	H	Pre	OH	H	H	H
Gartanina	Pre	H	Pre	OH	H	H	OH
Mangostanina		H	H	OH	H	H	H



El mangostán ha sido usado como ingrediente en varias preparaciones comerciales como cápsulas, suplementos nutricionales y bebidas suplementadas. Algunos ejemplos de estos productos son: XanGo™, Mangoxan y Vemma, los cuales pueden ser adquiridos vía internet y en tiendas naturistas (Lozoya, 1993).

1.3 XanGo™

El XanGo™ es un suplemento alimenticio, compuesto del puré de la fruta entera de mangostán y una combinación de otros jugos de fruta como jugo de manzana, uva, pera, arándano, frambuesa, fresa, arándano agrio y cereza. También contiene ácido cítrico,

sabores naturales, pectina, goma xantana y benzoato de sodio. La información nutricional se presenta en la Tabla 3 (Los datos se obtuvieron del envase primario del XanGo™ y de Marcason, 2006).

Tabla 3. Información nutricional del XanGo™ (Cantidad por 30 mL).

Contenido energético	51 KJ 12 kcal
Proteína	0 g
Grasas (Lípidos)	0 g
Sodio	0 mg
Potasio	70 mg
Carbohidratos totales	3 g
Azúcares	2 g

Este producto se comercializa actualmente en diversos países mediante un sistema de comercialización de redes de mercadeo (multinivel). Diversos usuarios del producto han descrito algunos de los siguientes beneficios: un sistema inmune en óptimas condiciones, disminución de alergias y de inflamación, aunque también se ha postulado que puede tener un papel preventivo en diversas enfermedades como el cáncer. Estos beneficios no han sido evaluados aún en ensayos clínicos, así sus efectos en humanos solamente se presentan como testimonio de personas que lo han usado. No se ha asociado ningún efecto secundario adverso a la fruta, al jugo, o a los extractos enteros del mangostán (Ji *et al.*, 2007; Marcason, 2006).

1.4 Oxígeno y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO)

El oxígeno molecular (O₂) o dioxiógeno es uno de los gases más importante de la tierra: Constituye el 21% de la atmósfera (Tabla 4), 89% del agua de mar y, al menos el 47% de la corteza terrestre.

Tabla 4. Composición de gases de la atmósfera.

Componente	% presente en el aire
Nitrógeno	78.08
Oxígeno	20.95
Argón	0.93
Bióxido de carbono	0.03
Neón	0.0018
Helio	0.0005
Criptón	0.0001
Hidrógeno	0.00006
Ozono	0.00004
Xenón	0.000008

El oxígeno molecular es indispensable para la vida de los organismos aerobios pues es el último aceptor de los electrones en la cadena respiratoria, proceso indispensable en la producción de ATP. El sistema enzimático de la citocromo oxidasa mitocondrial reduce de manera tetravalente al oxígeno en agua (Eberhardt, 2001).

A altas concentraciones o bajo ciertas condiciones el oxígeno llega a ser tóxico. La toxicidad del oxígeno se puede explicar por la formación de las ERO dentro de las cuales están los radicales libres. Estas especies son más reactivas que el oxígeno en su estado basal de triplete (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2005)

1.2.1 Producción de especies reactivas

Radicales libres

Un radical libre (RL) es una especie química, ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente, posee uno o más electrones desapareados que ocupan por sí mismos un orbital molecular o atómico. Los RL se forman por ganancia o pérdida de un electrón de un no radical o por la ruptura homolítica de una molécula.

Es importante mencionar que los RL existen como derivados de muchos elementos o moléculas químicas. Los más importantes desde el punto de vista biológico son los derivados de oxígeno y del nitrógeno principalmente, aunque también destacan los derivados de

hidrógeno y del carbono, así como los formados por metales de transición como el hierro y el cobre, entre otros.

Una vez que se forma un radical pueden reaccionar con otro radical o con otra molécula por varias interacciones. La velocidad y la selectividad con que es llevada esta reacción, depende de la concentración del radical, de la deslocalización del electrón y de la ausencia de enlaces débiles con otras moléculas presentes junto al radical que pueden interaccionar.

Por otro lado, una especie reactiva es aquella que tiene la energía suficiente para reaccionar con otras moléculas y ceder parcial o totalmente parte de esa energía. A continuación se describen las especies reactivas y radicales libres de mayor importancia a nivel biológico (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2005; Aruoma, 1996).

Singulete de oxígeno ($^1\text{O}_2$)

Esta especie química no posee electrones desapareados; se forma por la inversión en el espín (invierte su rotación de giro) de uno de sus electrones en los orbitales moleculares externos, al recibir una cierta cantidad de energía. De los dos tipos de $^1\text{O}_2$ (forma $^1\Delta\text{O}_2$ y $^1\Sigma\text{O}_2$), el singulete de oxígeno delta ($^1\Delta\text{O}_2$, 22.4 kcal/mol) es el que tiene mayor importancia biológica que el singulete en forma sigma ($^1\Sigma\text{O}_2$, 37.5 kcal/mol) (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2005; Aruoma, 1996). En sistemas biológicos es producido por una gama de reacciones químicas, dentro de las que se encuentran la reacción entre el ácido hipocloroso y el peróxido de hidrógeno; reacciones catalizadas por enzimas como la mieloperoxidasa y lactoperoxidasa (Arouma *et al.*, 1996), y por exposición de los tejidos a la luz. El tiempo vida media total del $^1\text{O}_2$ es de 10^{-6} s dependiendo de la matriz que se encuentre a su alrededor (Aruoma, 1996), por lo que puede interaccionar con otras moléculas transfiriendo esta energía excitatoria o por combinación química.

Los blancos preferenciales del $^1\text{O}_2$ para reaccionar químicamente son compuestos con dobles ligaduras, ácidos grasos poliinsaturados o bases de DNA como la guanina (Diplock *et al.*, 1998).

Radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

Es un RL producido por un gran número de sistemas enzimáticos como la xantina oxidasa (XO), NADPH oxidasa (Yap *et al.*, 2007) (Fig. 3), óxido nítrico sintasa, lipooxigenasa, P₄₅₀ oxidasa y citocromo b5, a través de la salida de la cadena respiratoria; por reacciones de autooxidación y por vías no enzimáticas en diversos sitios celulares debido a la reducción incompleta del oxígeno molecular cuando se adiciona un electrón (Schnackenberg, 2002). El $O_2^{\bullet-}$ juega un papel central como un intermediario de especies reactivas que son formadas subsecuentemente, debido a que puede oxidar al ácido ascórbico, reducir a los complejos de hierro tal como la citocromo c y el ácido férrico-etilendiamino-tetraácetico (Fe^{3+}), dando como resultado la formación de otras especies reactivas como el H_2O_2 (Arouma *et al.*, 1996; Diplock *et al.*, 1998; Xiong *et al.*, 2007).

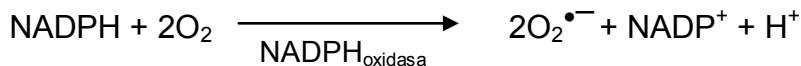


Fig. 3. Producción del $O_2^{\bullet-}$ por acción de la NADPH oxidasa en presencia de oxígeno.

Radical hidroxilo ($\bullet OH$)

Es un RL con mayor reactividad que los demás RL de oxígeno y nitrógeno, tiene una vida media estimada de 10^{-9} s (Arouma *et al.*, 1996), se formada *in vivo* por altas irradiaciones de energía (rayos X), por rompimiento homolítico del agua o en forma endógena partiendo del H_2O_2 y un metal que cataliza la reacción Fenton (M'bemba *et al.*, 2007) (Fig. 4). La alta reactividad de este radical implica inmediatamente su reacción con cualquier molécula, en el lugar en donde es formado (Arouma *et al.*, 1996; Diplock *et al.*, 1998).

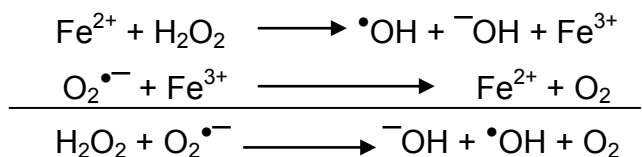


Fig. 4. Reacción de Fenton; producción de radical hidroxilo.

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Es una especie oxidante formada *in vivo* cuando el $O_2^{\bullet-}$ reacciona con otra molécula de $O_2^{\bullet-}$, a pH neutro. Esta reacción puede ser acelerada catalíticamente por la superóxido dismutasa (SOD) (Yap *et al.* 2007) (Fig. 5). El H_2O_2 a bajos niveles es poco reactivo, sin embargo a niveles altos el H_2O_2 puede atacar a varios sistemas de producción de energía debido a su gran facilidad de difusión entre las células, por ejemplo, desacopla la glicólisis al inhibir a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

El H_2O_2 puede también formar $\bullet OH$ en presencia de metales de transición y el $O_2^{\bullet-}$ puede facilitar la reacción. El H_2O_2 es eficientemente convertido a agua por la enzima catalasa, proceso que es el que determina el tiempo de vida media de éste (Diplock *et al.*, 1998; Arouma *et al.*, 1996).

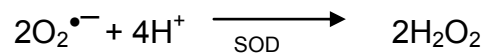


Fig. 5. Generación de H_2O_2 .

Ácido hipocloroso (HOCl)

Es una especie altamente oxidante y productora de reacciones de clorinación. Se produce en los fagocitos activados por la acción de la enzima mieloperoxidasa (MPO), ésta en combinación con H_2O_2 puede oxidar a los halógenos y a los pseudo halógenos de tiocianato (SCN^-) a sus correspondientes ácidos hipo halogenados (Fig. 6). El cloruro es el mejor sustrato para la MPO; consecuentemente, el ácido hipocloroso (HOCl) es el mejor producto de la oxidación de la MPO (Yap *et al.*, 2007; Winterbourn *et al.*, 2006; Winterbourn, 2002).

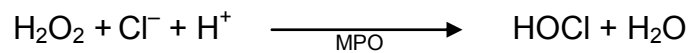


Fig. 6. Formación del HOCl a partir del $H_2O_2 + Cl^-$

El HOCl tiene un pKa de 7.59; así a pH fisiológico se presenta una mezcla de las dos especies, HOCl y OCl^- (Kawai *et al.*, 2006). El HOCl tiene la capacidad de atravesar la membrana celular de los tejidos y blanco reaccionar con biomoléculas intracelulares, produciendo clorinaciones aromáticas, adición a dobles ligaduras, formación de cloraminas y de aldehídos así como oxidación de sulfhídricos y tíoéteres (Whiteman *et al.*, 2005). Además, puede reaccionar con el nitrito generando un producto más citotóxico, el cloruro de nitrilo

(NO₂Cl) el cual posee la habilidad de producir clorinación y nitración (Yap *et al* 2007) o reaccionar con el O₂^{•-} para formar [•]OH (Winterbourn *et al.*, 2006).

Anión peroxinitrito (ONOO⁻)

Es un fuerte oxidante estable en solución en comparación con las demás moléculas oxidantes. Se forma por la interacción del radical óxido nítrico (NO[•]) (producido por la óxido nítrico sintasa) y el O₂^{•-}. Aunque el peroxinitrito no es un radical libre, es mucho más reactivo que sus moléculas predecesoras; su vida media es de 10-20 milisegundos (Pacher *et al.*, 2007), en la célula este puede difundirse e interacciona con nucleófilos y moléculas con carga positiva, con grupos ricos en electrones, con centros enzimáticos que contienen metales de transición: modificando el grupo prostético hemo, tal como la hemoglobina, mioglobina, citocromo c. También reacciona rápido con complejos de hierro-sulfuro (inactiva enzimas del metabolismo incluyendo a la aconitasa mitocondrial y la fosfogluconato deshidrogenasa), puede alterar la estructura de las proteínas y su función por la reacción con varios aminoácidos (preferentemente con la cisteína). Disminuye la concentración de glutatión, induce lipoperoxidación en lipoproteínas, interfiere con la señalización celular por la nitración de residuos de tirosina en proteínas (Pacher *et al.*, 2007; Diplock *et al.*, 1998) lo cual afecta a proteínas estructuralmente y funcionalmente resultando en la generación de antígenos epítopes, cambiando la actividad catalítica de las enzimas, alterando la organización del citoesqueleto y deteriorando la señalización intracelular (Pacher *et al.*, 2007).

Además, los productos de descomposición del ONOO⁻ son radicales libres. Estos productos son formados por dos mecanismos (Fig. 7). El primer mecanismo implica la protonación del ONOO⁻ para formar al ácido peroxinitroso (ONOOH), el cual experimenta una descomposición homolítica y genera al radical dióxido de nitrógeno ([•]NO₂) que es altamente reactivo y al [•]OH. El segundo mecanismo es la reacción entre el ONOO⁻ y el dióxido de carbono (CO₂) para formar nitrosoperoxocarbonato (ONOOCO₂⁻), el cual se puede descomponer y dar origen al [•]NO₂ y al radical carbonato (CO₃^{•-}) (Xiong *et al.*, 2007; Pacher *et al.*, 2007).

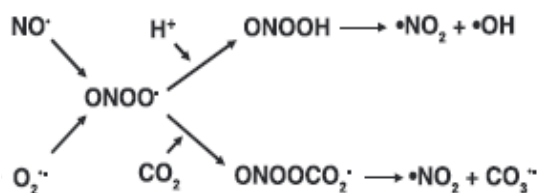


Fig. 7. Formación del peroxinitrito (ONOO^-), a partir del anión radical superóxido de oxígeno ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), y sus productos de descomposición.

Los radicales derivados del ONOO^- ($\bullet\text{NO}_2$, $\bullet\text{OH}$ y $\text{CO}_3^{\bullet-}$) pueden iniciar la lipoperoxidación celular por el ataque a ácidos grasos insaturados o causar reacciones de carbonilación en proteínas, por la susceptibilidad de sus aminoácidos. Los tioles pueden ser oxidados también por estos radicales formados, generando radicales til ($\text{RS}\bullet$) y radicales tiil ($\text{RSH}\bullet$) que pueden reaccionar con el oxígeno y promover el estrés oxidativo a través de la propagación de reacciones de radicales libres, o reaccionar con $\bullet\text{NO}$ y formar nitrosotioles (Xiong *et al.*, 2007; Pacher *et al.*, 2007).

Resumen de formación de especies reactivas

En primera instancia durante la reducción univalente del oxígeno a agua se pueden generar ERO, debido a los procesos biológicos naturales o en procesos inmunológicos. Estas ERO al interactuar con enzimas como la MPO y la óxido nítrico sintasa dan paso a la formación de otras especies como el HOCl, singulete de oxígeno y ERN (Xiong *et al.* 2007; Yap *et al.* 2007; Ministerio de salud publica, 2001) (Fig. 8).

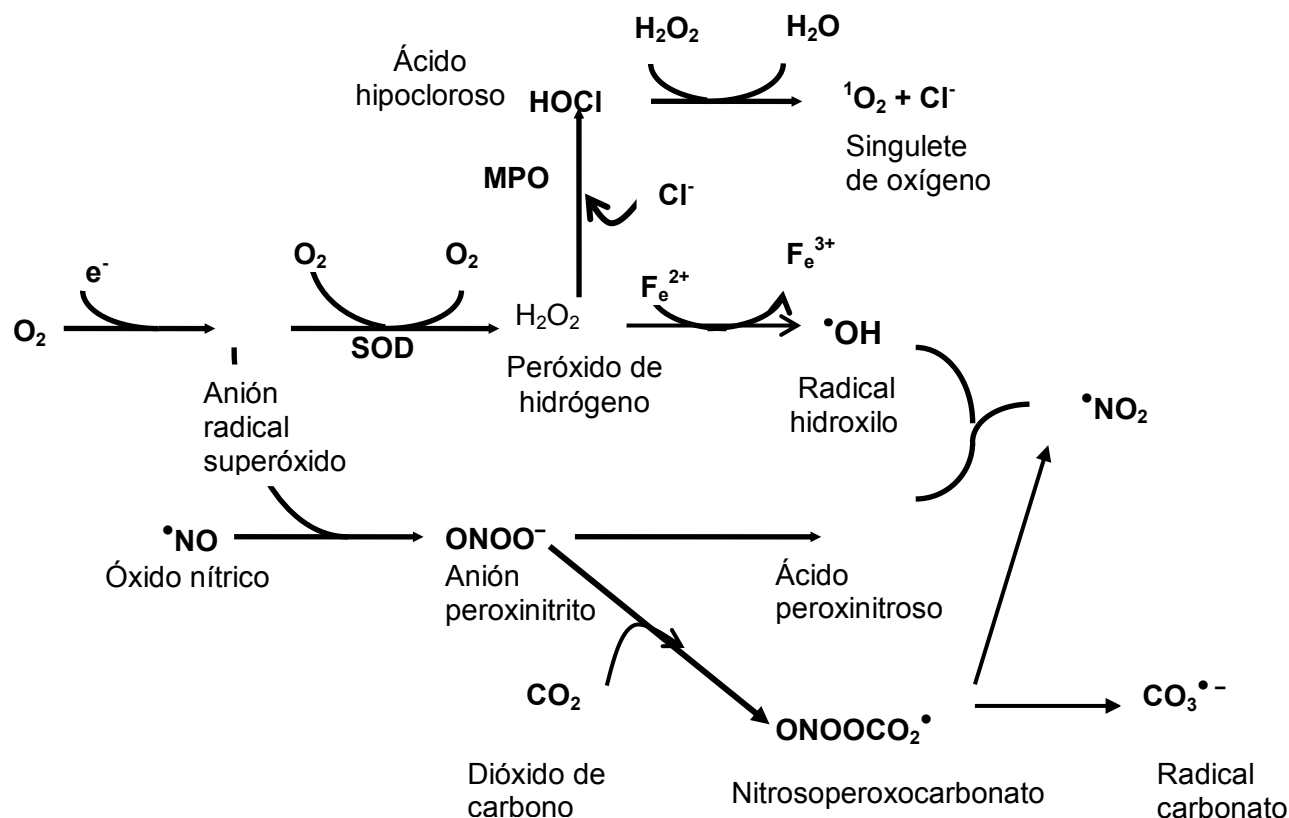


Fig. 8. Generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.

1.3.1 Estrés oxidativo y nitrosativo

La sobreproducción intracelular de ERO y de ERN puede provocar estrés oxidativo y nitrosativo. Esta condición se refiere a un desbalance entre la producción intracelular de especies reactivas y los mecanismos de defensa celular (descritos más adelante). En el estrés oxidativo y nitrosativo; se presenta un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y/o bien de nitrógeno, una disminución en los sistemas antioxidantes o de reparación, o a una combinación de estos factores. En esta situación se presentan daños de las macromoléculas por el rompimiento o modificación de su estructura, ocasionando en consecuencia alteraciones en la función celular o incluso, la muerte de la célula. También se ha observado que diversos factores ambientales como los contaminantes en el aire y la radiación ionizante pueden favorecer el estrés oxidativo y nitrosativo (Yap *et al.*, 2007).

1.3.2 Dualidad fisiológica de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

El estrés oxidativo y nitrosativo ha sido considerado como un accidente del metabolismo aerobio. Sin embargo, el paradigma ha ido cambiando acerca de las ERO y ERN, puesto que se han apreciado como moléculas señalizadoras cuyos productos pueden ser reguladores de partes de la ruta de la transducción de señalización celular (Gomes *et al.*, 2006; Schnackenberg, 2002).

El H₂O₂ regula la expresión de genes a través del factor nuclear κ B (Diplock *et al.*, 1998; Hensley *et al.*, 2000). El ¹O₂ forma especies de peróxido implicados en la señalización (Agon *et al.* 2006). El NO[•] regula el tono vascular, regula también funciones endoteliales e inhibición de agregación plaquetaria (Gomes *et al.*, 2006).

Además, las ERO y ERN también se encuentran implicadas en la respuesta inmune contra microorganismos y sustancias extrañas. Dentro del proceso respuesta inmune se encuentra la fagocitosis que es acompañado por la activación del NADPH oxidasa, un complejo enzimático que se ensambla en la membrana fagosomal y convierte al oxígeno dentro de esta en O₂^{-•} (importante defensa antimicrobiana); este puede combinar con NO[•] y formar ERN o dismutarse y producir H₂O₂. Este último es empleado al mismo tiempo por la MPO dentro del fagosoma, quien cataliza la formación de HOCl partiendo de cloro y H₂O₂, dando como resultado que el conjunto de estos procesos confieran características líticas al fagosoma lo que le permite la lisis de los microorganismos fagocitados (Winterbourn *et al.*, 2006).

1.3.3 Enfermedades asociadas a las ERO y ERN.

Las ERO, ERN y halógenos de cloro, son capaces de causar daño oxidativo a biomoléculas, dando lugar a modificaciones químicas, como: son rompimiento de dobles ligaduras, entrecruzamientos entre el DNA y proteínas (daño principalmente en aminoácidos como cisteína, histidina, metionina, triptófano y tirosina), modificación de azúcares y lípidos (Jenner *et al.*, 1998). Aquellos blancos de mayor importancia dependen del tipo de célula sujeta al estrés oxidativo y como reaccionan ante tal estrés. Los mecanismos de las especies reactivas han sido implicados en numerosas condiciones clínicas, como daño por isquemia y reperfusión (infartos al miocardio por fumar y trasplante de órganos), defectos en glóbulos rojos, enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, diabetes, aterosclerosis, hipertensión,

enfermedades cardiovasculares, retinopatías, hemorragias oculares, cataratogénesis, daño degenerativo retinal (Arouma 1996), cáncer (Diplock *et al.*, 1998), enfermedades renales, hipertrofia vascular y miocardial, y enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Butterfield *et al.*, 1997).

1.3.4 Antioxidantes

Definición

Antioxidante es aquella sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones con respecto al sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación del sustrato. La capacidad antioxidante CI_{50} se expresa como la concentración del antioxidante necesario para inhibir el 50% de la formación de cada especie reactiva, por lo tanto entre menor sea el CI_{50} , mayor es la capacidad antioxidante de la muestra (Diplock *et al.*, 1998).

1.3.5 Sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos

Los organismos han desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante, tanto de naturaleza enzimática como no enzimática. A continuación se describen algunos de estos antioxidantes.

Antioxidantes enzimáticos

i) La superóxido dismutasa (SOD), enzima que se encuentra en el citoplasma (Cu,Zn-SOD), en la mitocondria (Mn-SOD) y en el fluido extracelular (Cu-Zn SOD), cataliza la conversión del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . ii) La catalasa, la cual se encuentra en las mitocondrias y los peroxisomas, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua. iii) La glutatión peroxidasa (GPX), es una selenoenzima presente en varias isoformas, entre las que se encuentran la GPx citosólica, la GPx plasmática y la GPx de fosfolípidos, cataliza la reducción de peróxidos empleando dos moléculas de glutatión reducido (GSH). iv) La glutatión S-transferasa (GST), cataliza la conjugación de GSH con una gran cantidad de compuestos orgánicos, además puede reducir hidroperóxidos de lípidos por medio de una actividad de GPX independientemente del selenio y además, pueden detoxificar al 4-hidroxinonal un producto de la peroxidación de lípidos (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2005). Se han encontrado dos isoformas GST citosólica y GST microsomales,

Algunas funciones antioxidantes indirectas son mediadas por el reestablecimiento de los niveles de antioxidantes endógenos, este es el caso de la glutatión reductasa (GR), enzima localizada en el citoplasma, que cataliza la reducción del GSSG a GSH empleando como coenzima al NADPH. Otra función antioxidante indirecta es la prevención de la formación de especies reactivas controlando los niveles de aniones como el hierro y cobre, actividad llevada a cabo por la acción de proteínas que atrapan a estos iones, por ejemplo la ferritina, la transferrina y la ceruloplasmina (Diplock *et al.*, 1998).

En la Tabla 5 se resumen las enzimas antes mencionadas y las reacciones que catalizan

Tabla 5. Enzimas antioxidantes y reacciones que catalizan

Enzima	Reacción
SOD	$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$
CAT	$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$
GPx	$ROOH + 2 GSH \longrightarrow GSSG + ROH$
GST	$RX + GSH \longrightarrow RSG + HX$
GR	$GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow NADP^+ + 2GSH$

ROOH = hidropéroxidos orgánicos, RX = compuesto orgánico, GSH = glutatión en forma reducida, GSSG = glutatión en su forma oxidada.

Antioxidantes no enzimáticos.

Los antioxidantes no enzimáticos actúan como moléculas suicidas al neutralizar a un radical libre, la mayoría de estos son antioxidantes exógenos. Los más comunes incluyen al ácido ascórbico (ver sección antioxidantes de referencia), GSH (ver sección antioxidantes de referencia), el alfa-tocoferol (vitamina E), carotenoides, flavonoides, ácido úrico, bilirrubina y tioles.

El alfa tocoferol y el beta caroteno son solubles en H₂O, que actúan sinérgicamente previniendo la lipoperoxidación en membranas biológicas y tienen la capacidad de interrumpir la lipoperoxidación en la fase de propagación.

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en los primates y funciona como un buen atrapador de radicales peroxilo, $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, $ONOO^-$, radical oxido nítrico y ozono (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2005; Diplock *et al.*, 1998).

Antioxidantes de referencia.

La vitamina C, el GSH, el ANDG y la DL-penicilamina, se usaron como antioxidantes de referencia (Maldonado *et al.*, 2005).

Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico es un agente reductor y antioxidante sintetizado en vertebrados partiendo del D-glucuronato (Linster y Van, 2007), es soluble en agua con un pKa de 4.25 por lo que se encuentra en altas concentraciones en muchos tejidos como ascorbato. En una interacción con especies reactivas el ascorbato es oxidado a dehidroascorbato pasando por un intermediario, el semidehidroascorbato que posteriormente da paso al dehidroascorbato. El dehidroascorbato es reciclado nuevamente a ácido ascórbico por la enzima dehidroascorbato reductasa, así el dehidroascorbato es encontrado nuevamente en pequeñas niveles en comparación con el ascorbato (Halliwell y Gutteridge, 1999).

La actividad antioxidante del ascorbato se debe a la capacidad que tiene de atrapar electrones en los grupos de la posición 2,3 enodiol. (Linster y Van, 2007) (Fig. 9).

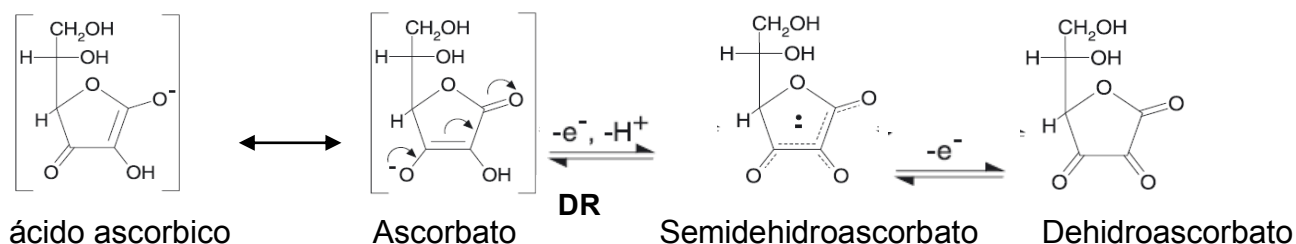


Fig. 9. Formación del dehidroascorbato por interacción del ácido ascórbico con ER (DR = dehidroascorbato reductasa).

El ascorbato tiene la capacidad para atrapar ERO como: $HOCl$, 1O_2 , H_2O_2 , $\bullet OH$ y $O_2^{\bullet-}$. Protege membranas celulares contra el daño e interviene en la regeneración de otros antioxidantes como la vitamina E (Diplock *et al.*, 1998; Halliwell y Gutteridge, 1999).

GSH

Se encuentra intracelularmente en un rango de concentraciones de 0.5 a 10 mM y representa más del 90% del total de los compuestos no proteicos de bajo peso molecular que contiene tioles (Fig. 10), se encuentra mayoritariamente en forma reducida y solo el 5% se encuentra como glutatión oxidado (GSSH) (Harwood *et al.*, 2006).

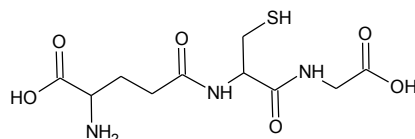


Fig. 10. Estructura química del GSH; compuesto de glicina, cisteína y ácido glutámico.

Protege a los grupos sulfhídrico de las proteínas de la acción oxidante del H_2O_2 , HOCl , $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el $^{\bullet}\text{OH}$, además el GSH es el mayor tiol citosólico, puesto que es cofactor para varias enzimas detoxificadoras, como ya se menciono anteriormente.

DL-Penicilamina

La DL-penicilamina es un producto de degradación de la penicilina es un metabolito inerte contra actividad microbiana, estructuralmente se relaciona con el aminoácido cisteína, por lo que se la conoce como B, B-dimetilcisteína, compuesto doblemente sustituido con grupos metilos y un grupo sulfidrilo (Fig. 11), actúa como potente quelante de cobre. Presenta acción antiinflamatorio en algunas formas de artritis (Gupte y Mumper, 2007), es usado para pacientes con la enfermedad de Wilson, artritis reumatoide y algunos padecimientos de hígado, prolonga el tiempo de protrombina y ascitis (Ala *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2007). Además es un buen atrapador de ONOO^- (Maldonado *et al.*, 2005).

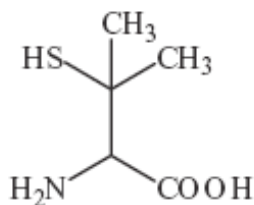


Fig. 12. Estructura de la DL-penicilamina

Ácido nordihidroguaiarético (ANDG)

Es un polifenol (Fig. 12), presente en altas concentraciones en las hojas del arbusto *Larrea tridentata*, se encuentra en el suroeste de USA y el norte de México; se utiliza como antioxidante en productos herbolarios y suplementos alimenticios (Sahu *et al.*, 2006).

Es un atrapador eficaz de ONOO^- , $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ y HOCl (Floriano-Sánchez *et al.*, 2006).

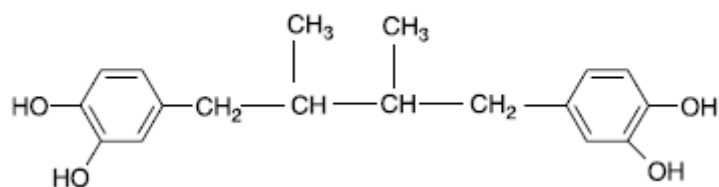


Fig. 12. Estructura química del ANDG.

2. Justificación

En la medicina herbolaria se conoce un gran número de plantas medicinales. Las cuales tienen una buena aceptación en los distintos sectores de la población debido a su eficacia en el tratamiento de diversas enfermedades. Dentro de esta gama de plantas medicinales la cáscara del fruto de mangostán (*Garcinia mangostana* L) se le han atribuido una gran cantidad de propiedades medicinales entre las que destaca su capacidad antioxidante. Sin embargo, hasta el momento no se han reportado las propiedades antioxidantes *in vitro* del mangostán, para varias especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

3. Objetivos general

- √ Determinar si el extracto acuoso de la cáscara del mangostán y el jugo comercial de mangostán tiene la capacidad de atrapar las siguientes especies reactivas: $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, HOCl, H_2O_2 y ONOO^- .

Objetivos particulares.

- √ Determinar el valor de CI_{50} del extracto acuoso de extracto de la cáscara del mangostán y XanGoTM para: $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, HOCl, H_2O_2 y ONOO^- .
- √ Determinar el valor de CI_{50} de los antioxidantes de referencia: GSH, ANDG, vitamina C y DL-penicilamina, para las especies reactivas mencionadas.
- √ Comparar los valores de CI_{50} del extracto de la cáscara del mangostán y XanGoTM con los correspondientes CI_{50} de los antioxidantes de referencia.

4. Materiales y métodos

Los reactivos fueron adquiridos de las siguientes compañías:

- Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA): N, N-Dimetil-4-nitrosoanilina (DMNA) # cat. D17, 240-5, sulfato amoniacal de hierro (II) hexahidratado # cat. 215406, L-ácido ascórbico # cat. A-1417, hidroxitolueno butilado (BHT) # cat. B-1378, catalasa de hígado de bovino # cat. C-9322, L histidina # cat. H-8000, dióxido de manganeso (MnO_2) # cat. M-3138, glutatión forma reducida (GSH) # cat. G-4251, sal sódica de naranja de xilenol # cat. 09826, DL- Penicilamina # cat. P5125, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) # cat. D-6518, dimetil sulfóxido (DMSO) # cat. D-5878, nitrito de potasio (KNO_2) # cat. P3437, xantina X-0626, ácido nordihidroguaiarético (ANDG) # cat N-1144, azul de nitrotetrazolio (NBT) # cat. N-6876 y xantina oxidasa # cat. X-4376.
- J. T Baker (México, D. F): Hidróxido de sodio (NaOH) # cat. 3722, fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) # cat. 3828, fosfato de sodio monobásico monohidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), # cat. 3818, hipoclorito de sodio (NaOCl) solución al 5% de cloro disponible, # cat. 9416-0 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en solución al 30% # cat. 2186.
- Mallinckrodt (Paris, KY, USA): Carbonato de sodio (Na_2CO_3) # cat. 7527.
- Cayman Chemical (Ann Arbor, Mi, USA): Dihidrorodamina 123 (DHR) # cat. 85100.

Todos los reactivos fueron grado analítico.

- DNP International Inc. Co. (Whittier, CA, EUA): extracto de la cáscara del mangostán, número de lote: NPMP37285.
- XanGo LLC (Orem, UT, EUA): Jugo Xango™, # de lote So62562 y So62563.
- Para realizar las mediciones espectrofotométricas se usó un espectrofotómetro Beckman Coluter, Du® - 640 y celda de cuarzo de 1 mL de volumen.

5. Desarrollo experimental

5.1 Preparación de las muestras

Preparación del extracto de la cáscara del mangostán:

1. Se prepararon 10 mL de una solución al 10% (en agua).
2. Se agitó durante 10 min.
3. Se centrifugó a $8,952 \times g/10$ min. / 4°C .
4. Se separó el sobrenadante y se cuantificó la capacidad antioxidante.

Preparación de la muestra de XanGo™

1. El contenido del envase se agitó para homogenizar el contenido.
2. Se tomaron 1.5 mL del jugo y se centrifugaron a $8,952 \times g/10$ min. / 4°C .
3. Se separó el sobrenadante y se cuantificó la capacidad antioxidante.

Determinación del contenido de sólidos del extracto de la cáscara del mangostán y del XanGo™.

1. Se midió el peso del recipiente de plástico hasta peso constante
2. Se colocó 1 mL del sobrenadante (de cada muestra) en el recipiente.
3. Se registró el peso (peso inicial).
4. El recipiente se colocó dentro del horno a 50°C durante 12 horas y posteriormente se colocó en un desecador eléctrico.
5. El recipiente se pesó varias veces hasta obtener el registro de un peso constante.
6. Este valor se restó al valor de peso inicial y la diferencia fue, la cantidad de sólidos presentes en 1 mL de extracto de extracto de la cáscara del mangostán y en 1 mL de Xango™.

5.2 Determinación de la capacidad atrapadora de ONOO^- *in vitro*

La reacción para determinar la capacidad atrapadora de ONOO^- se fundamenta en la oxidación de la dihidrorodamina 123 por la acción de esta especie reactiva, dando como resultado la formación de rodamina 123 (Fig. 13), la cual es detectada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm.

Si la muestra presenta propiedades antioxidantes, se disminuirá o anulará la formación de la rodamina 123.

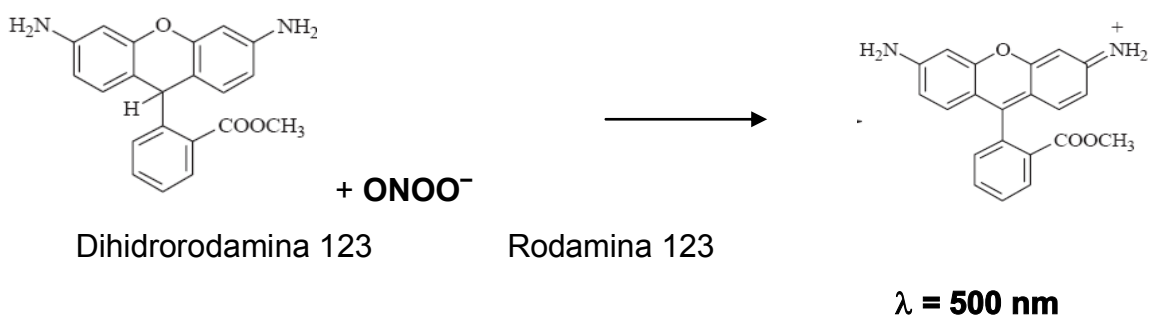


Fig.13. Evaluación de la actividad atrapadora de ONOO⁻ mediante la oxidación de la dihidrorodamina 123 a rodamina 123.

El ONOO⁻ y DHR usados para la cuantificación de la actividad antioxidante; se muestra su preparación en el apéndice.

Metodología para medir la capacidad atrapadora sobre el ONOO⁻

(Tomado de Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2007)

- √ El ensayo se realizó como se muestra en la Tabla 6; se hicieron las diluciones pertinentes de las muestras en agua desionizada

Tabla 6. Procedimiento empleado para determinar la capacidad antioxidante para ONOO⁻.

Solución para calibrar el espectrofotómetro a 500 nm.

Reactivo	μL
Amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4	350
DTPA 1 mM	50
H ₂ O desionizada	60
DHR 50 μM	50

Preparación del tubo de referencia

Reactivo	μL
Amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4	350
DTPA 1 mM	50
H ₂ O	50
DHR 50 μM	50
ONOO ⁻ 1.25 mM	10

Preparación del tubo con muestra

Reactivo	μL
Amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4	350
DTPA 1 mM	50
Muestra	50
DHR 50 μM	50
ONOO ⁻ 1.25 mM	10

- √ Para determinar el valor de Cl_{50} se le consideró al tubo de referencia con la máxima cantidad de DHR 123 formada por la acción del ONOO⁻ (100%), es decir si la muestra presenta capacidad atrapadora, al compararlo con el tubo de referencia, habrá una disminución parcial o total de rodamina123 formada por la acción del ONOO⁻.
- √ Durante todos los ensayos el tubo de referencia se tomó como un control interno, el cual se mantuvo en una densidad óptica promedio de 0.3 unidades de absorbancia.

5.3 Determinación de la capacidad atrapadora *in vitro* para el HOCl

El HOCl, se preparó a partir de una solución de NaOCl, ajustando a un pH de 6.5 con ácido sulfúrico 0.6 M. El fundamento de esta detección esta determinación se basa en la degradación de la enzima catalasa al interaccionar con el HOCl, dando como resultado la modificación del espectro de catalasa al hacer un barrido espectrofotométrico de 370 a 450 nm.

Si la muestra presenta propiedades atrapadoras para el HOCl, entonces el espectro de la catalasa no se modificará significativamente con respecto al de la catalasa sola (Fig. 14).

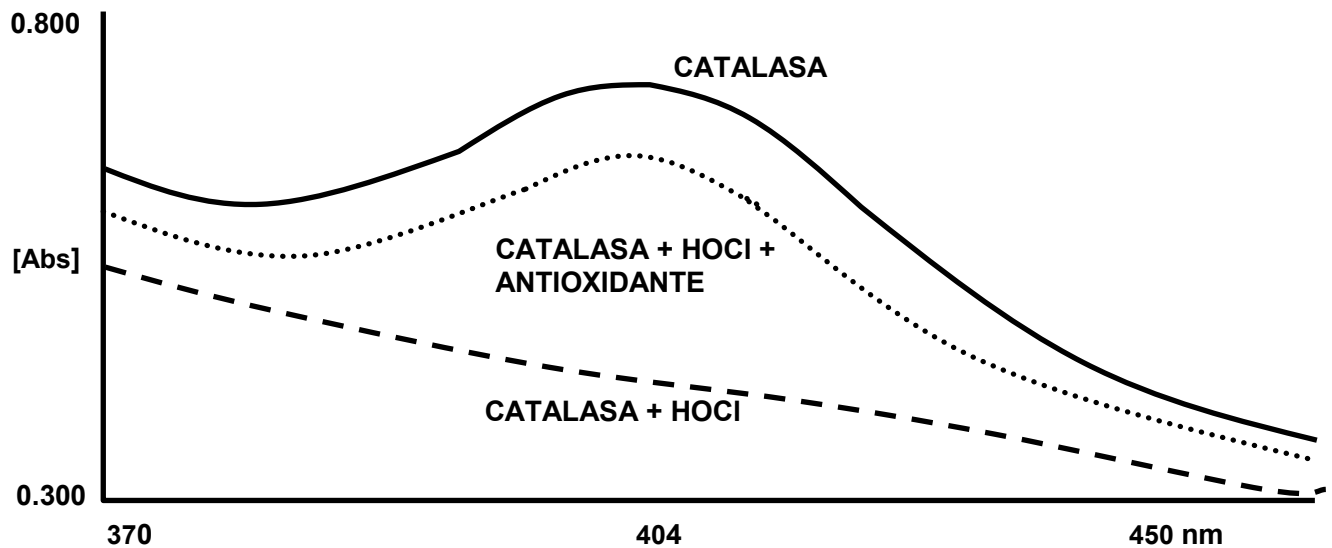


Fig. 14. Patrón espectrofotométrico de la catalasa en ausencia de HOCl (línea negra), en presencia de HOCl (línea discontinua) y catalasa, HOCl y muestra antioxidante (La línea punteada).

La preparación de HOCl, es descrita en el apéndice.

Metodología para medir la capacidad atrapadora sobre el HOCl

(Tomado de Aruoma y Halliwell, 1987).

1. Preparación de las muestras: se hicieron las diluciones pertinentes de los muestras a probar en agua desionizada, en cada uno de los experimentos.
2. Se realizó el análisis espectral de la catalasa a una longitud de onda de 370-450 nm, posteriormente se hizo el análisis espectral de la catalasa + HOCl (catalasa degradada) y por ultimo se probó la muestra con capacidad antioxidante, las cantidades de mezcla de reacción (Tabla 7).

Tabla 7. Procedimiento empleado para determinar la capacidad antioxidante para la especie reactiva de ácido hipocloroso.

Tubo de referencia de la catalasa intacta

Reactivo	μL
Catalasa 49.8 μM	150
Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4	300
HOCl 18 mM	-----

Tubo de la catalasa degradada por la acción del HOCl

Reactivo	μL
Catalasa 49.8 μM	150
Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4	150
HOCl 18 mM	150

Tubo de muestra

Reactivo	μL
Catalasa 49.8 μM	150
Muestra	150
HOCl 18 mM	150

- Para determinar la capacidad antioxidante de las muestras se tomó en consideración, el pico máximo de absorbancia de la catalasa (404 nm). La diferencia de la absorbancia de la catalasa intacta y la absorbancia de la catalasa degradada a la misma longitud, corresponde a la máxima cantidad de daño (100%) que se puede producir, debido a la acción del HOCl. Por lo tanto para hacer la cuantificación de la capacidad antioxidante se hizo la diferencia entre la absorbancia de la catalasa intacta y la absorbancia de la catalasa parcialmente degradada (con muestra) por el HOCl, y se compararon, como se muestra a continuación.

$$AA = \text{abs. Muestra} \times 100 / \text{abs. Control}$$

En donde $\text{abs. Muestra} = \text{Abs}_{\text{CAT}^-} - \text{abs}_{\text{CAT} + \text{HOCl} + \text{muestra}}$

Y $\text{abs. Control} = \text{abs}_{\text{CAT}^-} - \text{abs}_{\text{CAT} + \text{HOCl}}$

4. Durante el ensayo se utilizó como control el tubo de referencia con un delta de densidad óptica a 404 nm de 0.25 abs.

5.4 Determinación de la capacidad *in vitro* para la especie $^1\text{O}_2$.

El fundamento de la determinación de la capacidad atrapadora para $^1\text{O}_2$ considera que la especie $^1\text{O}_2$ reacciona con la histidina formando un compuesto reactivo que al reaccionar con DMNA (Fig. 15) provoca la disminución de la absorbancia a 440 nm de la DMNA (aclaración). Para esta técnica el $^1\text{O}_2$ se generó a partir de la reacción del NaOCl y H_2O_2 .

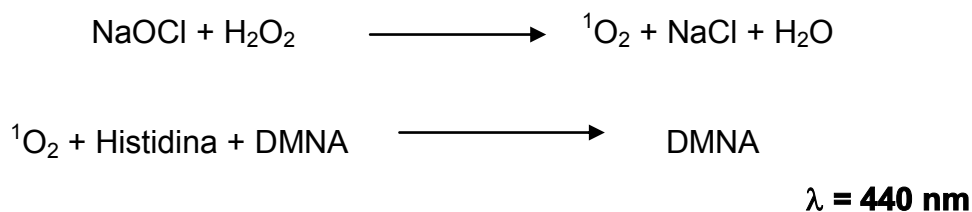


Fig. 15. Determinación de la capacidad atrapadora para la especie $^1\text{O}_2$

Si la muestra tiene capacidad atrapadora sobre el $^1\text{O}_2$, entonces impedirá la disminución de la absorbancia de la DMNA a 440 nm (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2005).

Metodología para medir la capacidad atrapadora sobre el $^1\text{O}_2$

(Tomado de Floriano-Sánchez *et al.*, 2006).

1. Preparación de muestras: se hicieron las diluciones pertinentes de las muestras a evaluar en agua desionizada.

Para determinar la capacidad atrapadora de la muestra hacia $^1\text{O}_2$, se siguió el siguiente procedimiento.

- √ Para el tubo control se usaron dos tubos. Al primer tubo se le midió la absorbancia inicial de la DMNA (t_0), para esto se le agregó la mezcla de reacción a excepción

del NaOCl y el volumen se completó a 1 mL con amortiguador de fosfatos 60 mM y se leyó inmediatamente. El segundo tubo se usó para determinar la absorbancia de la DMNA degradada, para esto se le agregó toda la mezcla de reacción y se incubó a temperatura de 25°C durante 40 min. y se leyó a 440 nm (Tabla 8).

- √ Para determinar la capacidad antioxidante de la muestra se usaron dos tubos. El primer tubo contenía la muestra a evaluar y los componentes de la mezcla de reacción a excepción de NaOCl; el volumen se completó a 1 mL con amortiguador de fosfatos 60 mM. Un segundo tubo (t_{40}) contenía la muestra y la mezcla de reactivos para generar el 1O_2 , se incubó a temperatura ambiente durante 40 min y se leyó a 440 nm.

Tabla 8. Procedimiento empleado para determinar la capacidad antioxidante para 1O_2

Procedimiento usado para los tubos control.		
Reactivo	Tubo t_0 (μ L)	Tubo t_{40} (μ L)
Amortiguador de fosfatos 60 mM pH 7.1	600	500
H ₂ O	100	100
Histidina 150 mM	100	100
H ₂ O ₂	100	100
DMNA 150 mM	100	100
NaOCl 150 mM	-----	100

Procedimiento usado para los tubos con muestra.		
Reactivo	Tubo t_0 (μ L)	Tubo t_{40} (μ L)
Amortiguador de fosfatos 60 mM pH 7.1	600	500
Muestra	100	100
Histidina 150 mM	100	100
H ₂ O ₂	100	100
DMNA 150 mM	100	100
NaOCl 150 mM	-----	100

- ✓ se determinó el porcentaje de atrapamiento al comparar el tubo control, contra el tubo con muestra y se calculó el porcentaje de atrapamiento, como se muestra a continuación.

$$AA = \Delta \text{abs. Muestra} \times 100 / \Delta \text{abs. Control}$$

En donde $\Delta \text{Abs.} = \text{abs. T}_0 - \text{abs. T}_{40}$

- ✓ Durante el ensayo se utilizó como control el tubo de referencia con un delta de densidad óptica a 440 nm de 0.9.

5.5 Determinación de la capacidad atrapadora $\text{O}_2^{\bullet-}$ *in vitro*

En este ensayo se generó el $\text{O}_2^{\bullet-}$ por la acción de la xantina oxidasa (Fig. 16) y se basa en que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ reduce al NBT formando formazán el cual absorbe a 560 nm.

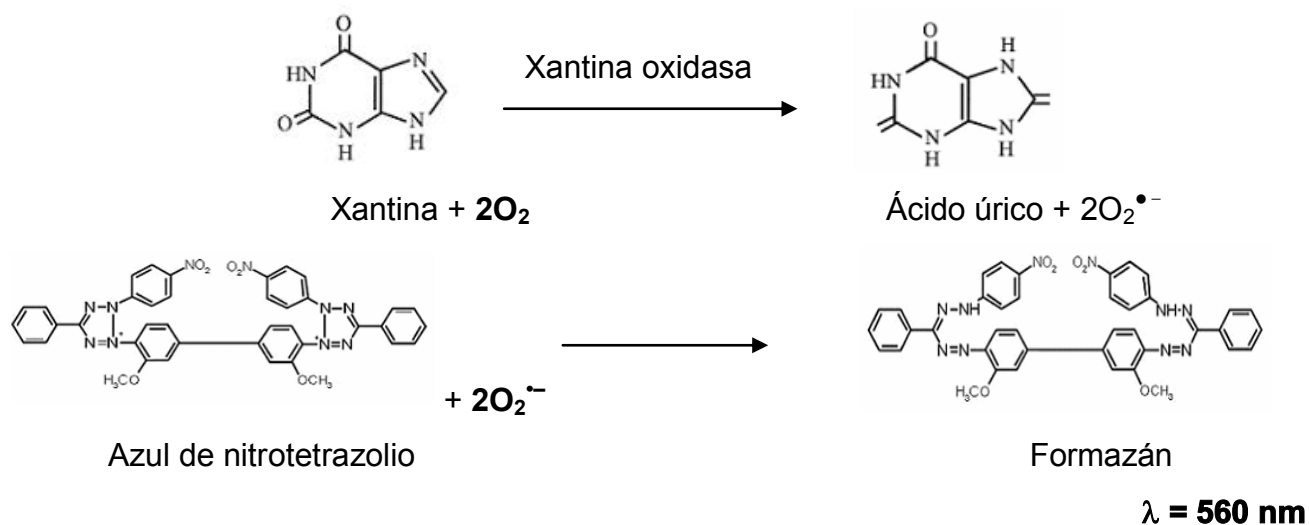


Fig. 16. Formación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ generado por el sistema xantina-oxidasa.

Si la muestra presenta capacidad antioxidante hacia esta especie reactiva entonces la formación del formazán se verá disminuida considerablemente con respecto al tubo de referencia; además, de que la producción de ácido úrico se mantendrá constante.

Metodología para medir la capacidad atrapadora de $O_2^{\bullet-}$

(Tomado de Floriano-Sánchez *et al.*, 2006).

1. Preparación de muestras: se hicieron las diluciones pertinentes de las muestras a probar en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0.
2. Para determinar la capacidad atrapadora de $O_2^{\bullet-}$ se siguió el procedimiento resumido en la Tabla 9.

Tabla 9. Procedimiento para determinar la capacidad antioxidante para el radical superóxido.

Reactivo	Tubo al 100% (μ L)	Tubo con muestra (μ L)
Xantina 0.5 mM	250	250
NBT 150 μ M	100	100
Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0	150	100
Muestra	-----	50
Xantina oxidasa 840 U/L	50	50

NBT= Azul de nitrotetrazolio

3. Iniciada la reacción se leyó cada minuto, durante 3 minutos a una longitud de onda de 295 y 560 nm.
4. Para determinar la capacidad antioxidante se procedió a tomar en cuenta el delta de absorbancia del tubo al 100% y compararlo con las deltas de absorbancia de las muestra, por medio de la siguiente operación.

$$AA = \Delta \text{abs. Muestra} \times 100 / \Delta \text{abs. Control 100\%}$$

En donde los Δ Absorbancia (Δ abs.) se calculan restando la absorbancia al $T_0 - T_1$, $T_1 - T_2$ y $T_2 - T_3$ y se determina el promedio de las 3 mediciones.

5. Durante el ensayo se utilizó como control una delta de densidad óptica a 560 nm de 0.05 y una delta de densidad óptica a 295 nm. de 0.1.

5.6 Determinación de la capacidad atrapadora de H₂O₂ *in vitro*

En esta técnica el H₂O₂ se midió de forma indirecta; el fundamento del ensayo considera que el H₂O₂ presente en el medio de reacción, oxida al ión ferroso (Fe²⁺) a su forma férrica (Fe³⁺). El ión férrico se une entonces a la sal sódica de naranja de xilenol y forma un complejo colorido que absorbe a una longitud de onda de 560 nm (Fig. 17).

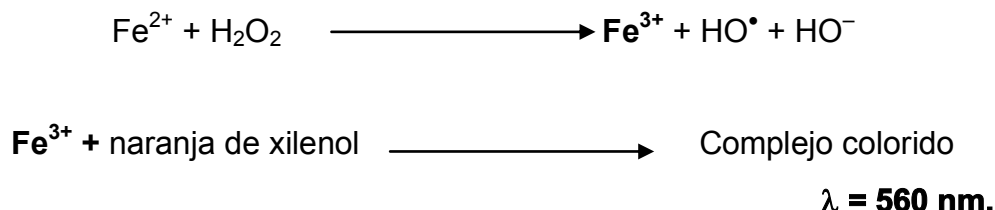


Fig. 17. Medición de H₂O₂ usando la técnica de Fe³⁺-naranja de xilenol (FOX).

Si la muestra presenta propiedades atrapadoras para H₂O₂, entonces no habrá oxidación del Fe²⁺ y por lo tanto no habrá producción de Fe³⁺, que pueda reaccionar con la sal sódica de naranja de xilenol

Metodología para medir la capacidad atrapadora del H₂O₂

(Tomado de Long *et al.*, 1999).

1. Se prepararon las muestras en agua desionizada.
2. Se preparó una solución de H₂O₂ de concentración de 50 mM y 500 mM
3. Se agregaron 50 µL de cada dilución de la muestra, y 50 µL de una disolución de H₂O₂ 50 mM en un tubo de vidrio (Tabla 10). Posteriormente se incubaron a diferentes tiempos (0.5 horas, 1 hora y 4 horas) a temperatura ambiente. El mismo procedimiento se siguió con la concentración de H₂O₂ 500 mM.

Tabla 10. Reactivos empleados en cada tubo, para determinar la capacidad antioxidante contra H₂O₂.

Reactivo	Blanco (µL)	Muestra (µL)
H ₂ O	50	-----
H ₂ O ₂	50	50
Muestra	-----	50

4. Transcurrido el tiempo de incubación se les agregaron 900 μL de reactivo de FOX y se dejó incubando durante 30 minutos más. Pasado este tiempo se leyó a una longitud de onda de 560 nm.
5. Para evaluar si los compuestos degradan H_2O_2 , la absorbancia de cada muestra se comparó con un blanco, el cual fue preparado bajo las mismas condiciones que las muestras, al cual sólo se completó el volumen con agua desionizada.
6. Durante el ensayo se utilizó como control el tubo de blanco.

Análisis estadístico

Para comparar la capacidad antioxidante de las muestras objeto de estudio con los compuestos de referencia, se usó el programa de estadística Graph Pad Prism versión 3.02, San Diego, CA, EUA.

Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar de la media. Se comparó el extracto acuoso de la cáscara del mangostán y el XanGoTM contra los compuestos de referencia, usando un ANOVA seguido de una prueba de Dunnett. También se realizó una t de Student para comparar a dos grupos. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

6. Resultados y discusión

Para determinar la capacidad atrapadora del extracto de la cáscara de mangostán y del XanGo™ se hicieron varias diluciones, y aquellas que mostraron una dependiente concentración-respuesta fueron las concentraciones que se usaron para determinar el valor de Cl_{50} .

Para determinar los valores de Cl_{50} de las distintas especies reactivas, se calcularon a partir de una recta ajustada por el método de mínimos cuadrados, tomando el semilogaritmo de la concentración vs. el por ciento de atrapamiento (Aruoma y Halliwell, 1987).

Peso constante

Se determinó que el extracto acuoso de la cáscara del mangostán presentó una cantidad de sólidos de 21.0 mg/mL y el XanGo™ 105.0 mg/mL.

6.1 Análisis espectrofotométrico del extracto de la cáscara del mangostán y del XanGo™

En la Fig. 18 se muestra el barrido espectrofotométrico del extracto del mangostán y del XanGo™, como se puede observar ambas muestras no interfieren con los ensayos para determinar la capacidad antioxidante de las distintas especies reactivas, debido a que la longitud a la cual comienzan a presentar absorción está dado en el rango de 300-200 nm. Además, se observa que tanto el extracto del mangostán y el XanGo™ presentan una composición similar ya que en los dos casos se obtuvieron dos máximos de absorbancia a 278 y 212 nm.

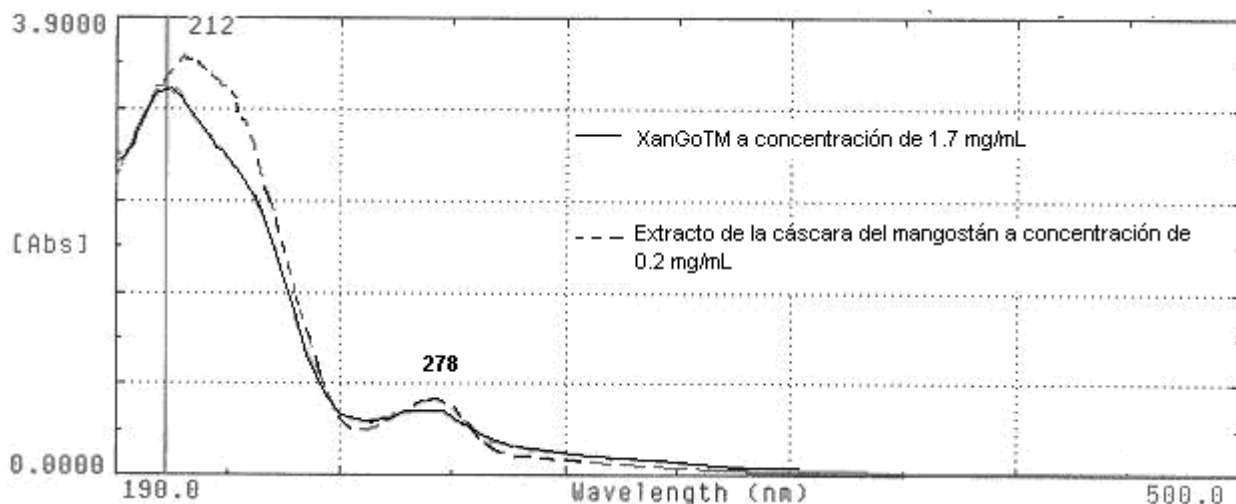


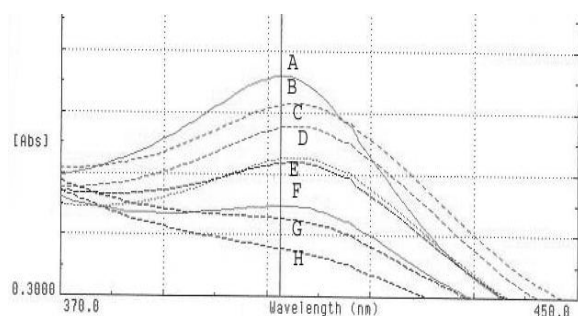
Fig. 18. Comparación de los espectros del extracto de la cáscara del mangostán y XanGo™.

6.2 Ensayo para medir actividad atrapadora de HOCl

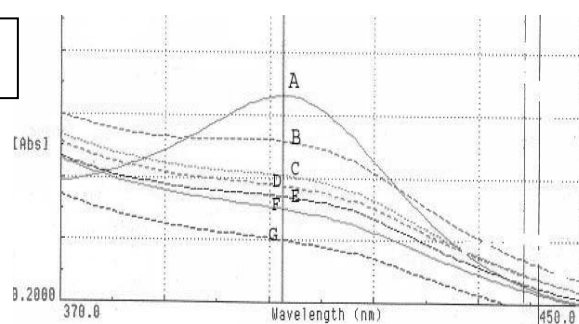
En el Fig. 19 se muestran los espectros obtenidos del ensayo de catalasa-HOCl. En el panel A se presenta al análisis espectral de la enzima catalasa, usando como antioxidante de referencia a la vitamina C. La línea A corresponde al espectro de la catalasa sin degradar, mientras que en la línea H se muestra a la catalasa con HOCl (degradada), y en las líneas de la B a la G, se muestran diferentes concentraciones de vitamina C. El conjunto de las líneas B-G nos muestra que la catalasa está protegida por la acción de la vitamina C, puesto, que al aumentar las concentraciones de vitamina C, la catalasa se va degradando aun menos y por lo tanto su espectro va siendo muy similar al que solo presenta la catalasa sin degradar.

En el panel B se observa al análisis espectral de la catalasa, con el extracto de la cáscara del mangostán, la línea A corresponde a la catalasa sin degradar, la línea G corresponde a la catalasa degradada por la acción del HOCl y las líneas B-F muestran a la catalasa con HOCl y muestra; se observa que al estar presente la muestra hay un efecto de inhibición del HOCl puesto que el espectro de la catalasa, se encuentra más parecido al de la catalasa sin degradar.

El panel C muestra a la catalasa con XanGo™; la línea A muestra a la catalasa intacta, mientras que en la línea G se muestra a la catalasa degradada por la acción del HOCl, y en las líneas B a F se observa la señal de la catalasa en presencia de diferentes concentraciones de XanGo™, mostrando el efecto protector del XanGo™ sobre la catalasa, al atrapar al HOCl.



A



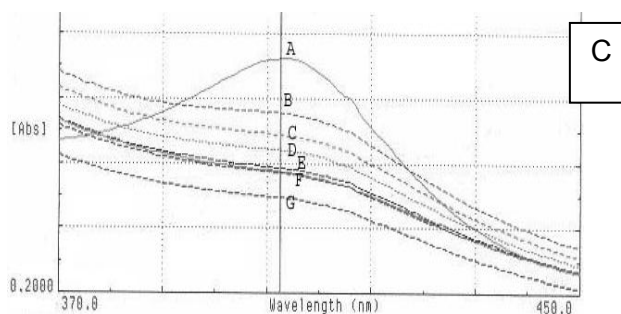
B

Vitamina C (antioxidante de referencia)

- A = línea de catalasa
- B = línea de catalasa + vitamina C [3170 µg/mL]
- C = línea de catalasa + vitamina C [2820 µg/mL]
- D = línea de catalasa + vitamina C [1410 µg/mL]
- E = línea de catalasa + vitamina C [740 µg/mL]
- F = línea de catalasa + vitamina C [350 µg/mL]
- G = línea de catalasa + vitamina C [180 µg/mL]
- H = línea de catalasa + HOCl

Extracto de la cáscara del mangostán (ECM)

- A = línea de catalasa
- B = línea de catalasa + ECM [470 µg/mL]
- C = línea de catalasa + ECM [350 µg/mL]
- D = línea de catalasa + ECM [230 µg/mL]
- E = línea de catalasa + ECM [170 µg/mL]
- F = línea de catalasa + ECM [140 µg/mL]
- G = línea de catalasa + HOCl



C

XanGo™

- A = línea de catalasa
- B = línea de catalasa + XanGo™ [2330 µg/mL]
- C = línea de catalasa + XanGo™ [1750 µg/mL]
- D = línea de catalasa + XanGo™ [880 µg/mL]
- E = línea de catalasa + XanGo™ [700 µg/mL]
- F = línea de catalasa + XanGo™ [580 µg/mL]
- G = línea de catalasa + HOCl.

Fig. 19. Espectros del ensayo de la actividad atrapadora para HOCl, de la vitamina C, extracto de la cáscara del mangostán y XanGo™, sobre la protección a la catalasa.

Capacidad atrapadora para HOCl

En la Fig. 20 se muestra el efecto protector de la vitamina C (panel C), extracto de la cáscara del mangostán y XanGo™ (panel A y B), se tomó en consideración la longitud de onda de 404 nm, longitud máxima de absorción de la catalasa. Los datos son expresados como porcentaje de atrapamiento y se compararon con el tubo de referencia. La presencia del extracto de la cáscara del mangostán, el XanGo™ y la vitamina C, disminuyen significativamente la concentración de HOCl, en forma dependiente de la concentración.

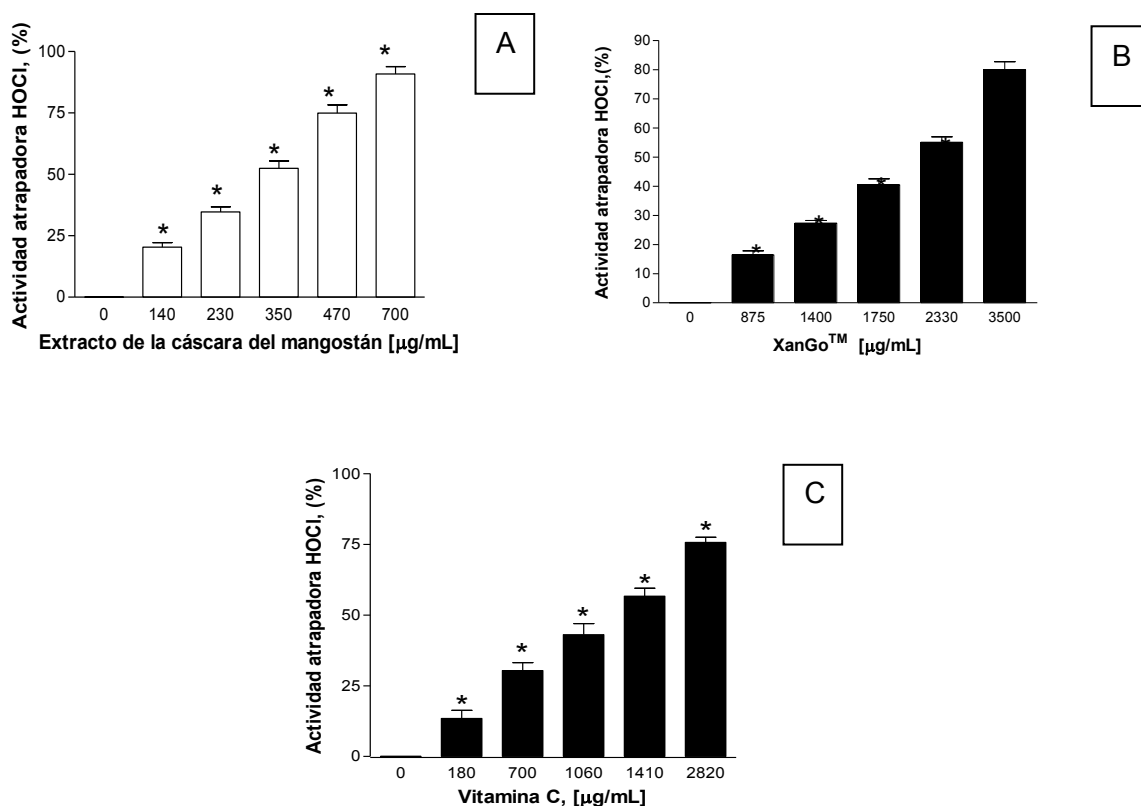


Fig. 20. Efecto mostrado por el extracto de la cáscara del mangostán (A), XanGo™ (B) y vitamina C(C) sobre la capacidad de atrapamiento de HOCl. Los datos están expresados como media \pm EE. $n = 6$. * $p < 0.001$ vs. Control (concentración 0 mM).

Capacidad de atrapamiento de HOCl de la vitamina C, el extracto de la cáscara del mangostán y el XanGo™

En la Fig. 21 se presentan los resultados obtenidos para la vitamina C, el extracto de la cáscara del mangostán y el XanGo™ de la capacidad de atrapamiento de HOCl significativamente la producción de HOCl en intervalos de 290-700 μg/mL extracto de la

cáscara de mangostán y 2,100-3,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ XanGoTM. En el caso de la vitamina C usado como antioxidante de referencia inhibió al HOCl significativamente en intervalos de 1,200-2,800 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se muestra además, que el extracto de la cáscara del mangostán y la vitamina C, presentan unas rectas con menor pendiente con respecto al XanGoTM y por lo tanto se ve reflejado en su capacidad antioxidante.

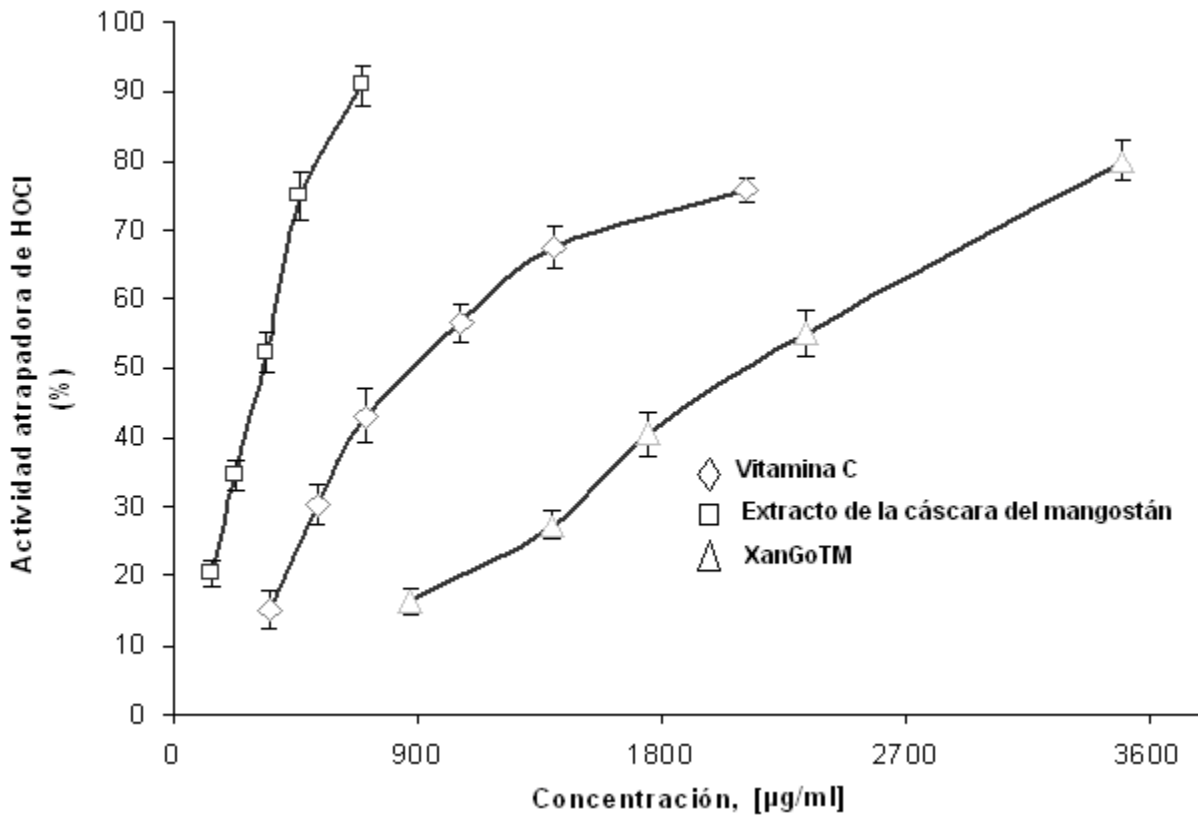


Fig. 21. Actividad atrapadora de HOCl. Los datos están expresados como promedio \pm EE, n = 6.

Capacidad de los antioxidantes para atrapar HOCl

En la Fig. 22 se muestra la comparación estadística de los valores de CI_{50} para el extracto de la cáscara del mangostán, el XanGoTM y la vitamina C. Se observa que el extracto de la cáscara del mangostán y el XanGoTM tienen diferencia estadística significativa con respecto al control que es la vitamina C.

El extracto de la cáscara del mangostán fue 4.2 veces más efectivo que la vitamina C para atrapar a la especie reactiva de HOCl, mientras que el XanGo™ es 0.6 veces menos efectivo que la vitamina C, para atrapar al HOCl.

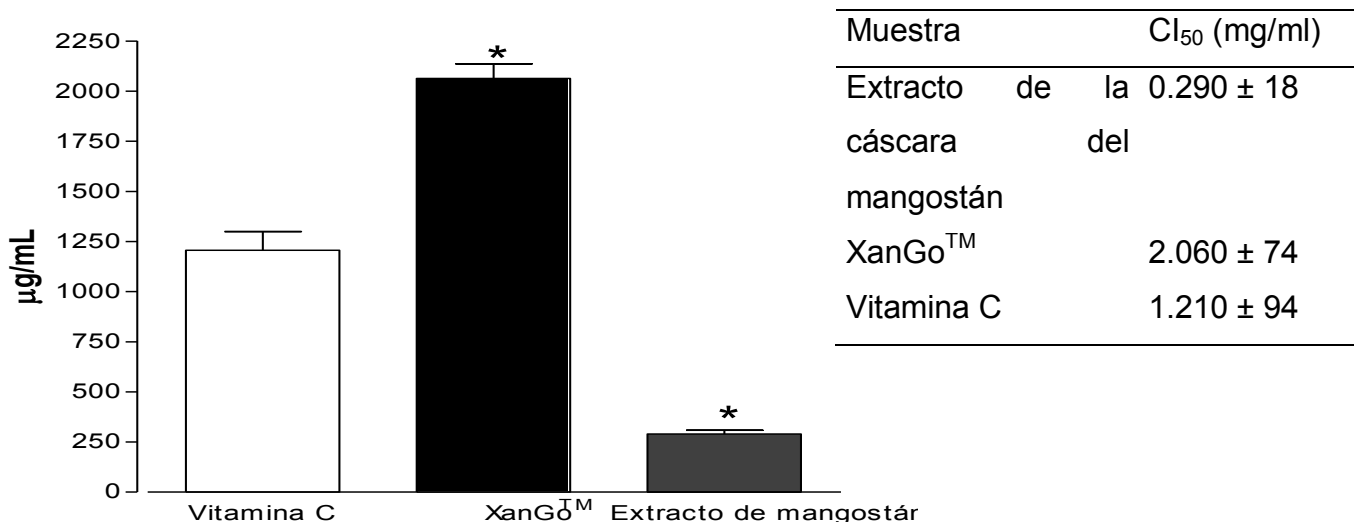
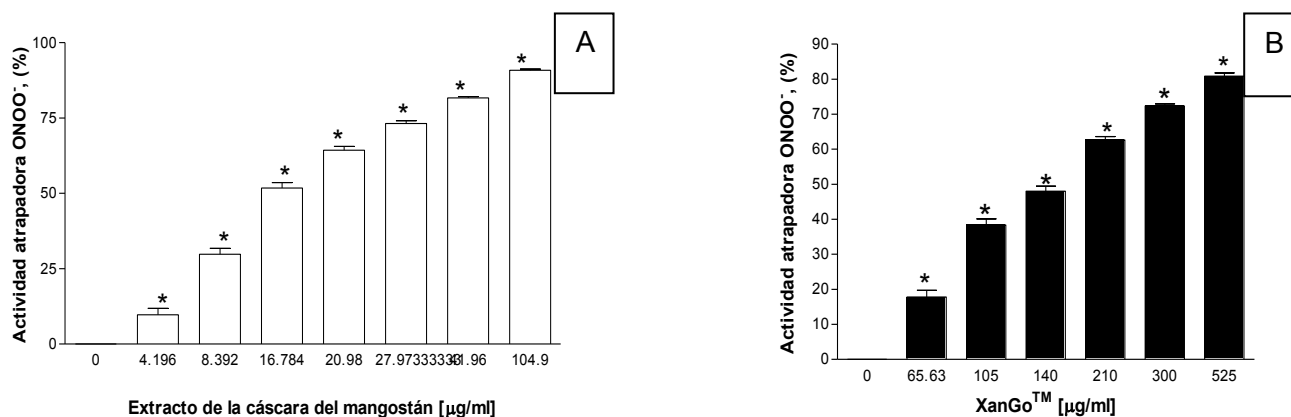


Fig. 22. Comparación de los valores de Cl₅₀. *P<0.001 vs. Vitamina C. Los datos están expresados como promedio ± EE, n = 6.

6.3 Capacidad atrapadora de la especie ONOO⁻ del extracto de la cáscara del mangostán y del XanGo™

En la Fig. 23 se muestra la capacidad del extracto de la cáscara del mangostán, XanGo™ (panel A y B) y de la DL-penicilamina (panel C) para atrapar ONOO⁻. Los datos se expresaron en porcentaje de atrapamiento de ONOO⁻ y se compararon con el tubo de referencia. Además, las tres muestras presentaron una dependiente de la concentración, en los rangos analizados; y disminuyeron significativamente la producción de rodamina 123.



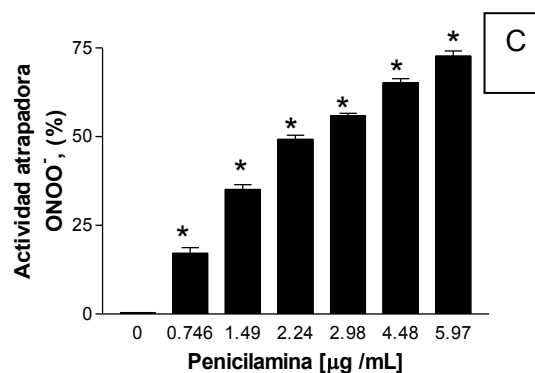


Fig. 23. Efecto mostrado por el extracto de la cáscara del mangostán (A), XanGo™ (B) y DL-penicilamina (C) sobre la capacidad de atrapamiento del peroxinitrito. Los datos están expresados como promedio ± error estándar, n = 6. *p<0.001 vs. control (concentración 0 mM).

En la Fig. 24 se presenta el comportamiento del extracto de la cáscara del mangostán, XanGo™ y DL-penicilamina usado como referencia para atrapar el ONOO⁻. Las concentraciones en la que se ve significativamente la inhibición del ONOO⁻, comienza en un rango de 15.49-105.0 µg/mL (extracto de la cáscara de mangostán), 147.2-525.0 µg/mL (XanGo™) y para DL-penicilamina 2.46-5.97 µg/mL.

Se observa que la DL-penicilamina presenta una mayor capacidad de atrapamiento puesto que su pendiente es uniforme, mientras que en el caso del extracto de la cáscara del mangostán y XanGo™ describen comportamientos menos lineales que la DL-penicilamina, por lo que el efecto atrapador del extracto de la cáscara del mangostán y XanGo™ para atrapar el ONOO⁻ formado, es menos efectivo que la DL-penicilamina.

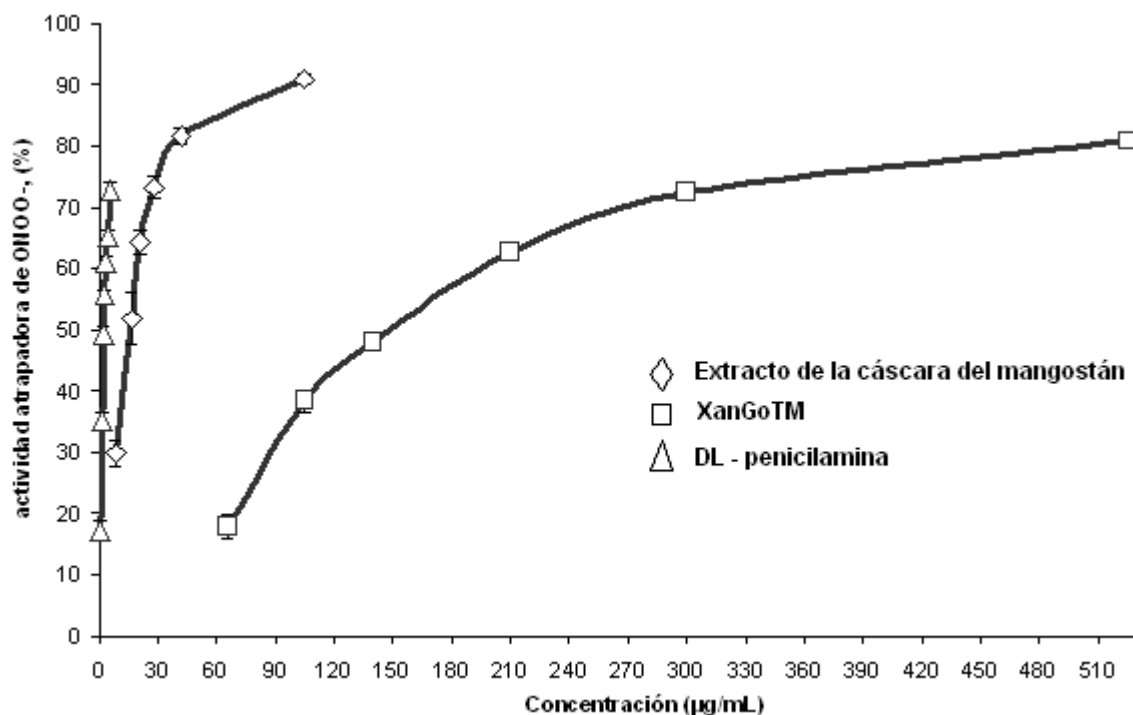


Fig. 24. Actividad atrapadora de ONOO⁻. Los datos están expresados como promedio ± EE, n = 6.

En la Fig. 25 se muestra la comparación de los valores de CI₅₀ del extracto de la cáscara del mangostán, XanGoTM y DL-penicilamina para la especie reactiva de ONOO⁻. Se muestra diferencia estadística significativamente entre el XanGoTM y la DL-penicilamina, mientras que el extracto de la cáscara de mangostán y la DL-penicilamina no se encontró diferencia significativamente estadística por medio de la prueba de ANOVA con una p>0.05, aunque al realizar un análisis de t de student, se encontró que presentaba diferencia significativa entre estos dos grupos con una p<0.05.

Por lo que el extracto de la cáscara del mangostán es 6.3 veces menos efectivo para atrapar ONOO⁻ que la DL-penicilamina, el XanGoTM es 58.8 veces menos efectivo que actividad que la DL-penicilamina para atrapar al ONOO⁻. Y además, 9 veces menos efectivo que el extracto de la cáscara del mangostán.

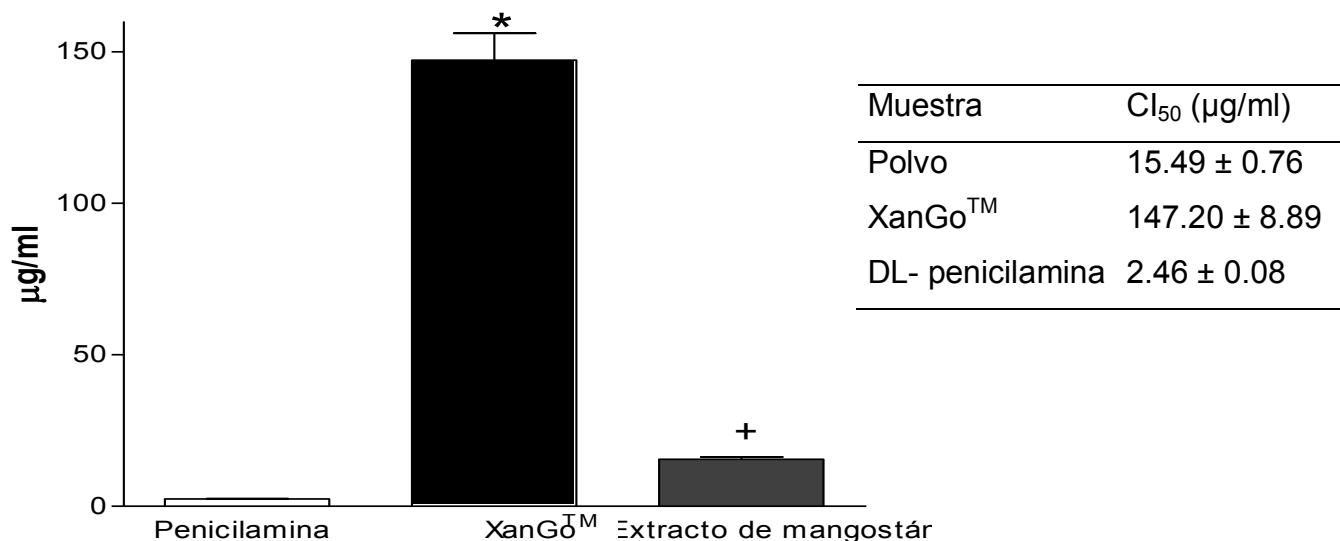


Fig. 25. Comparación de los valores de CI₅₀ para el extracto de la cáscara del mangostán, el XanGo™ y la DL-penicilamina. *P<0.001 vs. DL-penicilamina y +p<0.05 vs. DL-penicilamina. Los datos están expresados como promedio ± EE, n = 6.

6.4 Capacidad atrapadora para la especie ¹O₂

En la Fig. 26 se muestra los resultados obtenidos para el ensayo de atrapamiento para el ¹O₂, el panel A corresponde al extracto de la cáscara del mangostán y el panel B corresponde al GSH usado como antioxidante de referencia, en los dos casos se observa un atrapamiento significativo hacia la especie ¹O₂. Además, de que presentan un comportamiento concentración-respuesta.

El XanGo™ en esta determinación, no indujo una disminución del ¹O₂ en ninguna de las concentraciones evaluadas (0.11 g/mL-22 µg/mL) por lo que el Xango™ no presenta ninguna capacidad atrapadora para esta ERO.

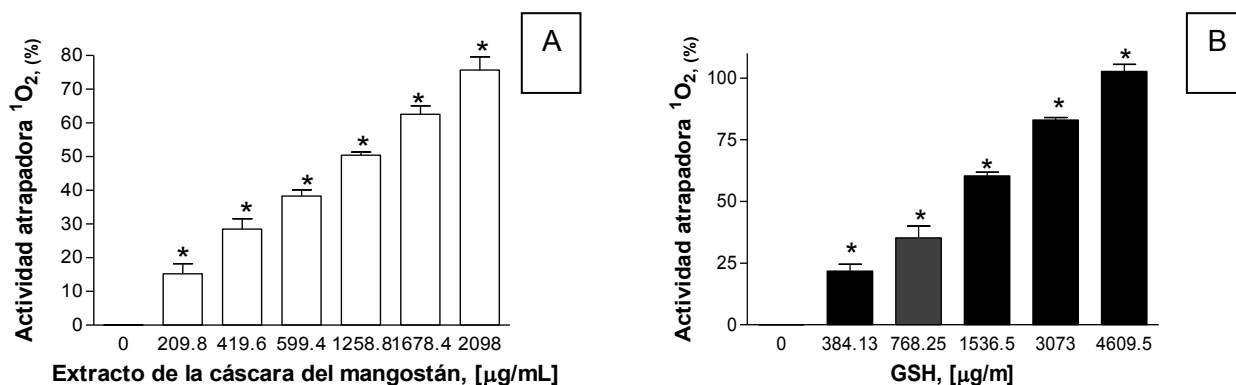


Fig. 26. Efectos del extracto de la cáscara del mangostán (A) y GSH (B) sobre el atrapamiento del $^1\text{O}_2$. Los datos están expresados como promedio \pm EE, n = 6. *p<0.001 vs. Control (concentración 0 mM).

En la Fig. 27 se presenta el comportamiento gráfico del extracto de la cáscara del mangostán y del GSH; los rangos de concentraciones en donde se observa significativamente la inhibición del $^1\text{O}_2$, son de 1046.2-2098 µg/mL y 1039.3-4609.1 µg/mL; para el extracto de la cáscara de mangostán y el GSH, respectivamente.

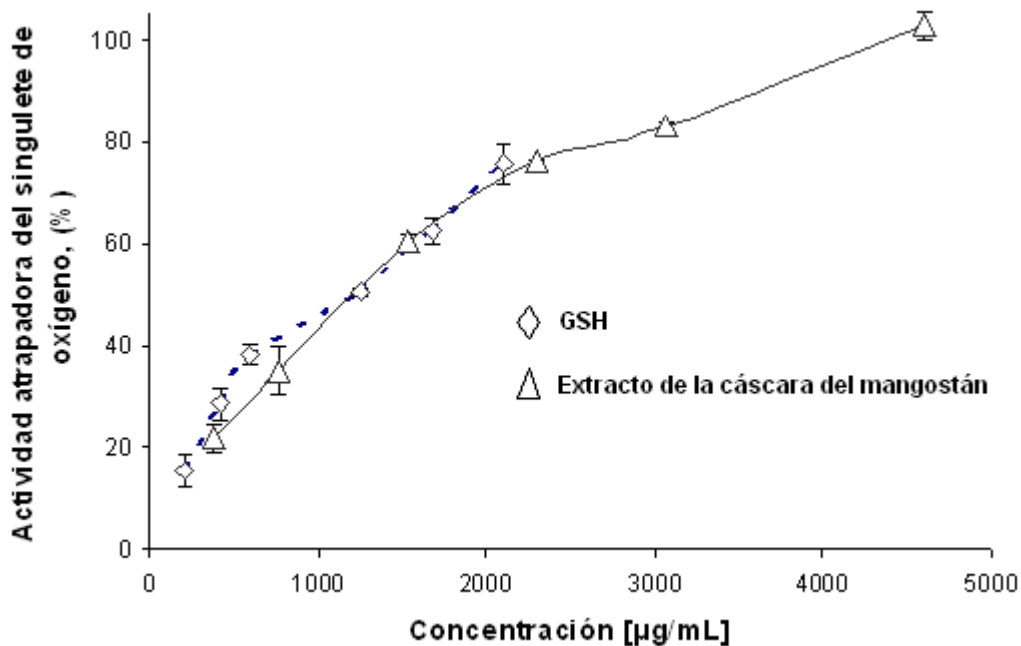
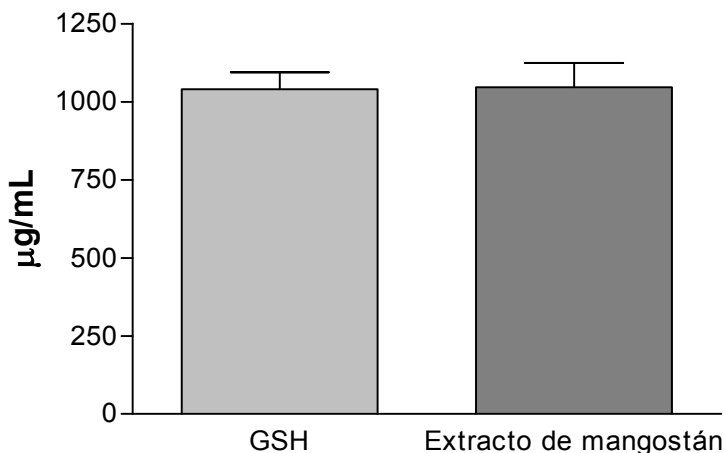


Fig. 27. Actividad atrapadora para el singlete de oxígeno. Los datos están expresados como promedio \pm EE, n = 6.

El análisis comparativo de los valores de CI_{50} permitió establecer que no existe una diferencia significativa (Fig. 28) entre el extracto de la cáscara del mangostán y el GSH. Por

lo tanto la efectividad para atrapar al 1O_2 del extracto de la cáscara del mangostán es similar a la del antioxidante de referencia.

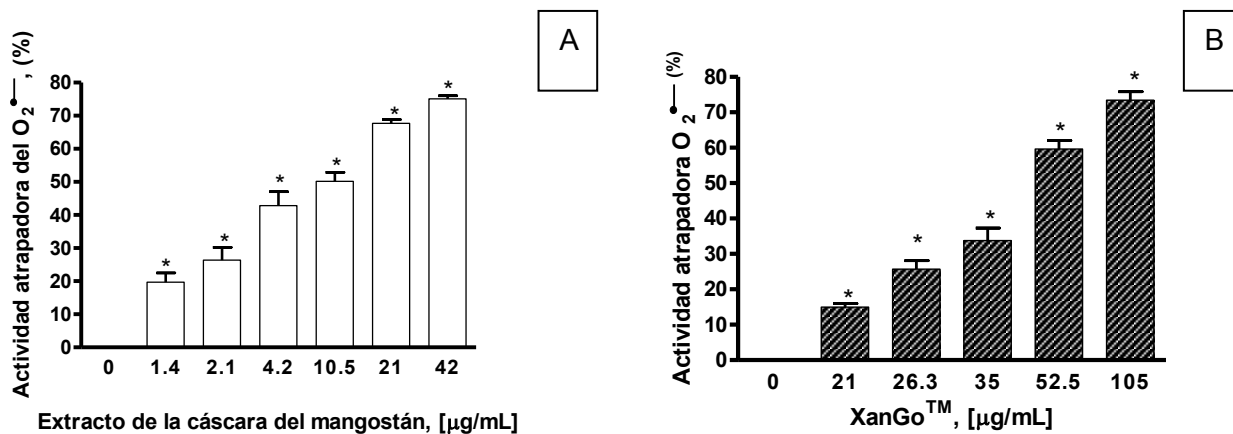


Muestra	CI ₅₀ (µg/ml)
extracto de la cáscara del mangostán	1046.12 ± 78.44
GSH	1039.91 ± 54.69

Fig. 28. Comparación de los valores CI₅₀ del extracto de la cáscara del mangostán y GSH, para el singulete de oxígeno. Se utilizó una prueba estadística de t de student para realizar la comparación de los dos grupos con una *p<0.05. Los datos son expresados como promedio ± EE, n = 6.

6.5 Radical superóxido

En la Fig. 29 se muestra la capacidad del extracto de la cáscara del mangostán, XanGo™ (panel A y B) y ANDG usado como antioxidante de referencia (panel C) para atrapar al $O_2^{\bullet-}$. Los datos se expresaron en porcentaje de atrapamiento del $O_2^{\bullet-}$ y fueron comparados con el tubo de referencia.



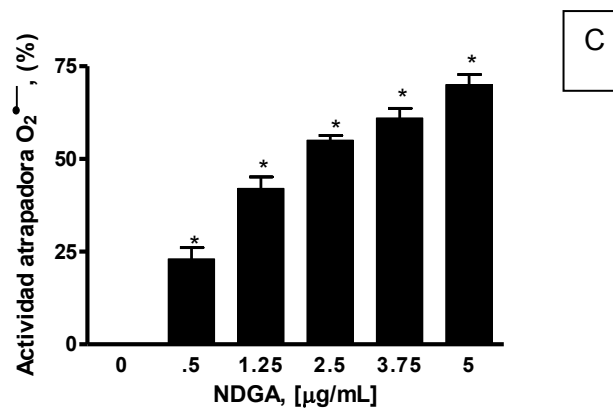


Fig. 29. Comportamiento del extracto de la cáscara del mangostán (A), XanGo™ (B) y ANDG (C). Sobre el atrapamiento del O₂^{•-}. *p<0.001 vs. Control (concentración 0 mM). Los datos son expresados como promedio ± EE, n = 6.

Las tres muestras evaluadas previenen significativamente la reducción del NBT, en un rango de 9.0- 46 µg/mL, 45.2-105.0 µg/mL y 2.2-5.0 µg/mL (Fig. 30), para el extracto, el XanGo™ y el ANDG, respectivamente.

Se observa que el ANDG presenta una mayor capacidad de atrapamiento a las concentraciones usadas puesto que su tendencia es uniforme, mientras que en el caso del extracto de la cáscara del mangostán y XanGo™ describen comportamientos menos lineales.

La interacción de las muestras con la xantina oxidasa, no modificaron el comportamiento de esta, pues no se vio afectada la producción de ácido úrico, la cual fue constante en cada ensayo realizado.

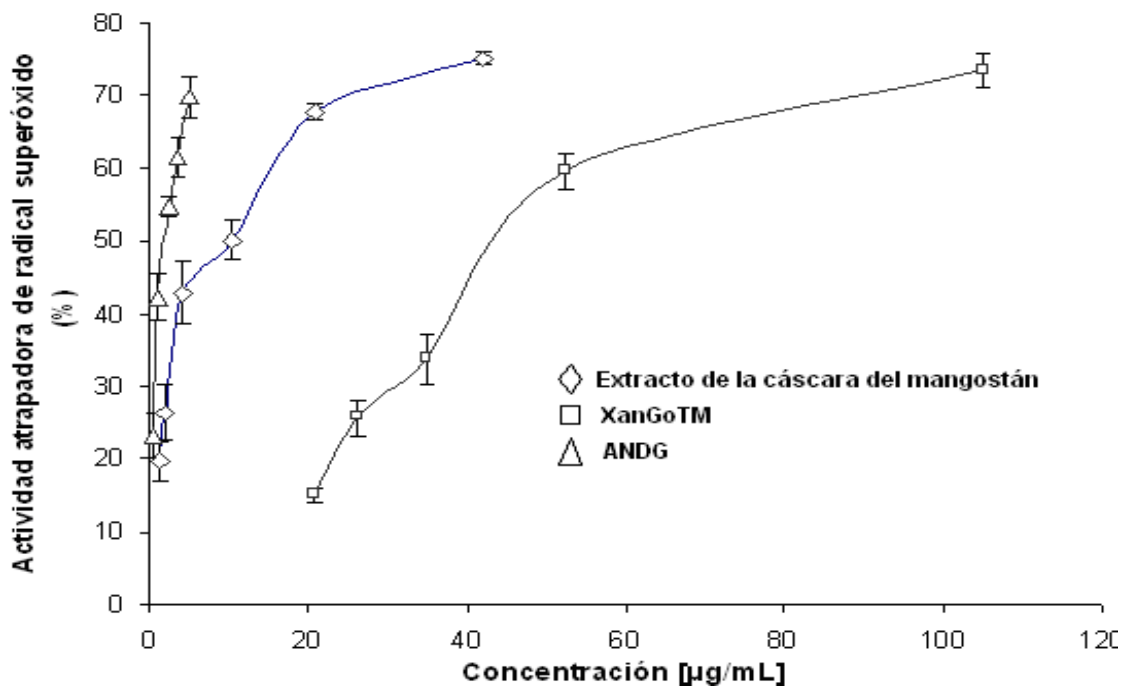


Fig. 30. Actividad atrapadora para el radical superóxido. Los datos están expresados como promedio \pm EE, $n = 6$.

En la Fig. 31 se muestra la comparación de los CI_{50} del extracto de la cáscara del mangostán, XanGo™ y ANDG. Se observa una diferencia significativamente estadística entre el extracto de la cáscara del mangostán, y XanGo™ contra el ANDG. El extracto de la cáscara del mangostán es 4.1 veces menos efectivo para atrapar $O_2^{\bullet-}$ que el ANDG, mientras que el XanGo™ es 20.8 veces menos efectivo que el ANDG.

Muestra	CI ₅₀ (µg/mL)
extracto de la cáscara del mangostán	9.0 ± 0.75
XanGo™	45.2 ± 2.9
ANDG	2.17 ± 0.13

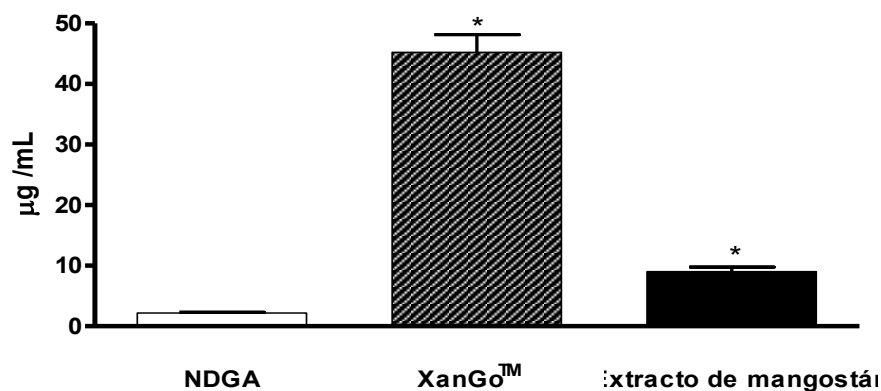


Fig. 31. Comparación de los valores de CI₅₀ del extracto de la cáscara del mangostán XanGo™ y ANDG. *P<0.001 vs. ANDG. Los datos están expresados como promedio ± EE, n = 6.

6.6 Peróxido de hidrógeno

El extracto de la cáscara de mangostán y el XanGo™ no mostraron capacidad atrapadora para el H₂O₂ a las concentraciones empleadas (mangostán en un rango de 21 mg/mL–7 µg/mL y el XanGo™ en un rango de 105 mg/mL -35 µg /mL) y a tiempos de monitoreo de 30 minutos, 1 hora y 4 horas con concentraciones de H₂O₂ de 25 y 250 mM al final del ensayo.

7. Resumen de resultados

- El análisis espectrofotométrico nos demuestra que el extracto de la cáscara del mangostán y XanGo™ presentan una composición similar, a las longitudes de onda de 278 nm y 212 nm. Además, la presencia de éstos no interfieren en los ensayos para determinar su capacidad antioxidante.
- El HOCl fue atrapada por el extracto de la cáscara del mangostán con CI_{50} de $290 \pm 18 \mu\text{g/mL}$, mientras que en caso el XanGo™ presentó un CI_{50} de $2060 \pm 74 \mu\text{g/mL}$. Al realizar la comparación de sus CI_{50} con la vitamina C, se encontró que el extracto de la cáscara del mangostán es mucho más efectivo para atrapar al HOCl, mientras que el XanGo™ tiene menor capacidad atrapadora que la vitamina C.
- El ONOO^- fue atrapado por el extracto de la cáscara del mangostán con una CI_{50} $15.49 \pm 0.76 \mu\text{g/mL}$ y por el XanGo™ con un CI_{50} $147.20 \pm 8.89 \mu\text{g/mL}$. Al comparar sus CI_{50} con la de la DL-penicilamina se encontró que el extracto de la cáscara del mangostán tiene una menor capacidad que la DL-penicilamina para atrapar al ONOO^- y el XanGo™ tiene una menor capacidad de atrapamiento que el polvo del mangostán y una gran diferencia al compararlo con la DL-penicilamina.
- El $^1\text{O}_2$ fue atrapado por el extracto de la cáscara del mangostán con un CI_{50} $1046.12 \pm 78.44 \mu\text{g/mL}$. El XanGo™ no tuvo la capacidad de atrapar a esta especie reactiva. Al comparar los CI_{50} del GSH con el del extracto de la cáscara del mangostán, se encontró que el extracto de la cáscara del mangostán tiene la misma efectividad que el GSH para atrapar al $^1\text{O}_2$.
- El $\text{O}_2^{\bullet-}$ fue atrapado por el extracto de la cáscara del mangostán con un CI_{50} de $9.0 \pm 0.75 \mu\text{g/mL}$ y el XanGo™ con una CI_{50} $45.2 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$. Al comparar sus CI_{50} con el ANDG se encontró que el extracto de la cáscara del mangostán y XanGo™ tienen una menor capacidad para atrapar el $\text{O}_2^{\bullet-}$ que el ANDG.
- El extracto de la cáscara del mangostán y XanGo™, no tienen la capacidad para atrapar al H_2O_2

Tabla 11. Resumen de la capacidad del extracto de la cáscara del mangostán y XanGo™ para atrapar especies reactivas y compuesto de referencia.

Muestra	$^1\text{O}_2$	$\text{O}_2^{\bullet-}$	ONOO^-	HOCl	H_2O_2	
Extracto de la cáscara del mangostán	1046 ± 78 (6)	9.0 ± 0.75 (6)	15.49 ± 0.76 ⁺ (6)	290 ± 18* (6)	No atrapa (3)	
XanGo™	No atrapa (3)	45.2 ± 2.9 (6)	147 ± 8.9* (6)	2060 ± 74* (6)	No atrapa (3)	
DL-Penicilamina			2.46 ± 0.08 (6)			
Vitamina C				1210 ± 94 (6)		
GSH	1039 ± 54 (6)					
ANDG		2.17 ± 0.13 (6)				

Los datos están expresados como la media ± EE del Cl_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$). El número de datos está entre paréntesis: GSH: glutatión reducido, $^1\text{O}_2$: singulete de oxígeno, $\text{O}_2^{\bullet-}$: anión superóxido, ONOO^- : anión peroxinitrito, HOCl : ácido hipocloroso, H_2O_2 : peróxido de hidrógeno. * $p < 0.001$ vs. antioxidantes de referencia y ⁺ $p < 0.05$ vs. antioxidantes de referencia.

8. Conclusiones

- √ Los resultados derivados del presente estudio indican que tanto el extracto de la cáscara del mangostán como el XanGo™ tienen la capacidad de atrapar las especies reactivas: HOCl, $O_2^{\bullet-}$ y ONOO⁻. Así mismo se demostró que ambos no tienen la capacidad para atrapar el H₂O₂. También se determinó que el XanGo™ no tiene la capacidad para poder atrapar al ¹O₂.
- √ El extracto de la cáscara del mangostán es más efectivo para atrapar a las especies estudiadas que el XanGo™.
- √ El extracto de la cáscara del mangostán es más efectivo que el compuesto antioxidante de referencia para atrapar HOCl, y presenta la misma efectividad que el compuesto antioxidante de referencia para atrapar el ¹O₂. En el caso del $O_2^{\bullet-}$ y del ONOO⁻, el extracto de la cáscara del mangostán tiene una menor capacidad que el antioxidante de referencia.
- √ El orden de eficacia de atrapamiento para el extracto de la cáscara del mangostán es el siguiente: $O_2^{\bullet-} > ONOO^- > HOCl > ^1O_2$ y para el XanGo™ es $O_2^{\bullet-} > ONOO^- > HOCl$.
- √ El presente trabajo constituye una aportación para justificar las propiedades antioxidantes que se le atribuyen al mangostán.

9. Perspectivas

1. Determinar las propiedades antioxidantes de las xantonas presentes en el mangostán para determinar cuál de ellas es la que presenta mayor capacidad antioxidante para cada una de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.
2. Se considera necesario realizar estudios más detallados con modelos *in vivo* para adquirir un conocimiento más profundo acerca de los mecanismos por medio de los cuales el mangostán y el XanGo™ pueden disminuir las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

10 Apéndice

Síntesis del ONOO⁻ de acuerdo a Beckman *et al.*, 1994. A continuación se describe la preparación de la **solución stock**.

1. Se preparó una solución de H₂O₂ 0.7 M en HCl 0.6 M.
2. Se montó una columna de MnO₂ colocando 4 g en una columna de vidrio de longitud de 5 cm, en cuya punta se colocó un tapón de algodón para evitar la salida de MnO₂ y la columna se lavó con NaOH 1.2 M frío.
3. La síntesis de ONOO⁻ se realizó de la siguiente manera: En un vaso de precipitado se agregaron 5 mL de NaOH 1.2 M y se dejó agitando en un baño de hielo. En tubos por separado se colocaron 5 mL de solución de H₂O₂ 0.7 M en HCl 0.6 M y 5 mL de KNO₂ 0.6 M. Posteriormente se agregaron casi de manera simultánea el KNO₂ y el H₂O₂ (en ese orden).
4. El H₂O₂ residual se removió pasando la solución a través de la columna de MnO₂.
5. La solución de ONOO⁻ se dividió en volúmenes de 0.5 mL que se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se guardaron a -80°C, hasta su uso.

Solución de trabajo de ONOO⁻ 1.25 mM

La concentración de ONOO⁻ se determinó antes de cada ensayo midiendo la densidad óptica de una dilución 1:50 a 302 nm, usando un coeficiente de extinción molar de 1,670 M⁻¹cm⁻¹. Se preparó una solución 1.25 mM en H₂O. Durante el ensayo esta solución se mantuvo en frío y protegida de la luz.

Solución stock de DHR 28 mM y solución de trabajo de DHR 50 μM

1. Se prepararon 0.206 mL de una solución de DHR123 28 mM en DMSO al 95% y se guardó en congelación y protegida de la luz.
2. A partir de la solución de DHR123 28 mM se preparó una solución 50 μM con H₂O que fue la que se usó en cada ensayo.

Preparación de HOCl

En cada ensayo se produjo y cuantificó la concentración de HOCl, de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Se mezcló 1 mL de NaOCl con 3.3 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4.

2. El pH de la mezcla se ajustó a 6.5 agregando H_2SO_4 250 mM
3. La concentración de HOCl se determinó a 235 nm, usando un coeficiente de extinción molar de $100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
4. Se preparó una solución 18 mM.

Preparación del reactivo de FOX

Reactivo de FOX: (metanol 90%; naranja de xilenol 100 μM ; hidroxitolueno butilado 4 mM y ácido sulfúrico 250 mM).

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

Reactivo 1 = Hidroxitolueno butilado 4 mM en metanol grado HPLC:

0.015686 g de hidroxitolueno butilado en 18 mL de metanol

Reactivo 2 = naranja de xilenol 1 mM y sulfato ferroso amoniacal 2.56 mM

1.52 mg de naranja de xilenol

2.0 mg de sulfato ferroso amoniacal

Disolver ambos en 2.0 ml de H_2SO_4 250 mM

Mezclar todo el volumen de ambos reactivos (en este ejemplo son 20 mL) para formar el reactivo FOX

Xantina 0.3 mM

Se calienta 1000 mL de agua destilada y se agregan 0.0456 g de xantina. Se disuelve la xantina calentando (sin llegar al punto de ebullición) con agitación y protegida de la luz. Al final se afora a 1000 mL con agua destilada y se guarda en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

Xantina oxidasa 840 U/L

Para preparar 2 mL de un lote con 0.16 U/mg de sólido se necesitan 10.5 mg de xantina oxidasa, como se muestra en el cálculo.

$$\begin{array}{rcl}
 0.16 \text{ U} - 1\text{mg} & & 5250 \text{ mg} - 1000 \text{ mL} \\
 840 \text{ U} - X \text{ mg} & & x \text{ mg} - 2 \text{ mL} \\
 x = 5250 \text{ mg} & & x = 10.5 \text{ mg}
 \end{array}$$

Preparación de amortiguadores

Amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4.

Na_2HPO_4 8.604 g

NaH_2PO_4 5.434 g

Se ajusta el pH y se afora con agua desionizada a un litro.

Amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4.

Na_2HPO_4 4.313 g

NaH_2PO_4 2.707 g

Se ajusta el pH y se afora con agua desionizada a un litro.

Amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0.

Na_2HPO_4 2.707 g

NaH_2PO_4 4.26 g

Se ajusta el pH y se afora con agua desionizada a un litro.

11. ANEXO

Como parte complementaria del presente estudio, se procedió a realizar la separación e identificación de la xantona más abundante en el mangostán, la α -mangostina (Jung *et al.*, 2006; Ee *et al.*, 2007; Suksamrarn *et al.*, 2006) para posteriores análisis. El procedimiento que se realizó fue el siguiente:

11.1 Preparación del extracto orgánico de *G. mangostana* L.

El polvo del pericarpio del mangostán con el que se preparó el extracto se obtuvo de Tailandia molido y seco. Un Kilogramo de polvo se llevó a un proceso de maceración con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH 1:1 durante 15 días a temperatura ambiente, se utilizaron 4 litros de la mezcla. El extracto resultante se filtró y se concentró al vacío a presión reducida en un rotaevaporador. Con este procedimiento se obtuvieron 161.3 g del extracto crudo concentrado de color café oscuro (extracto seco, Fig. 32).

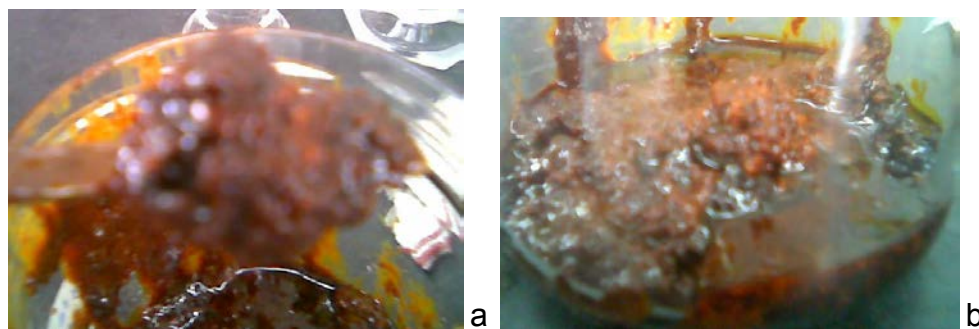
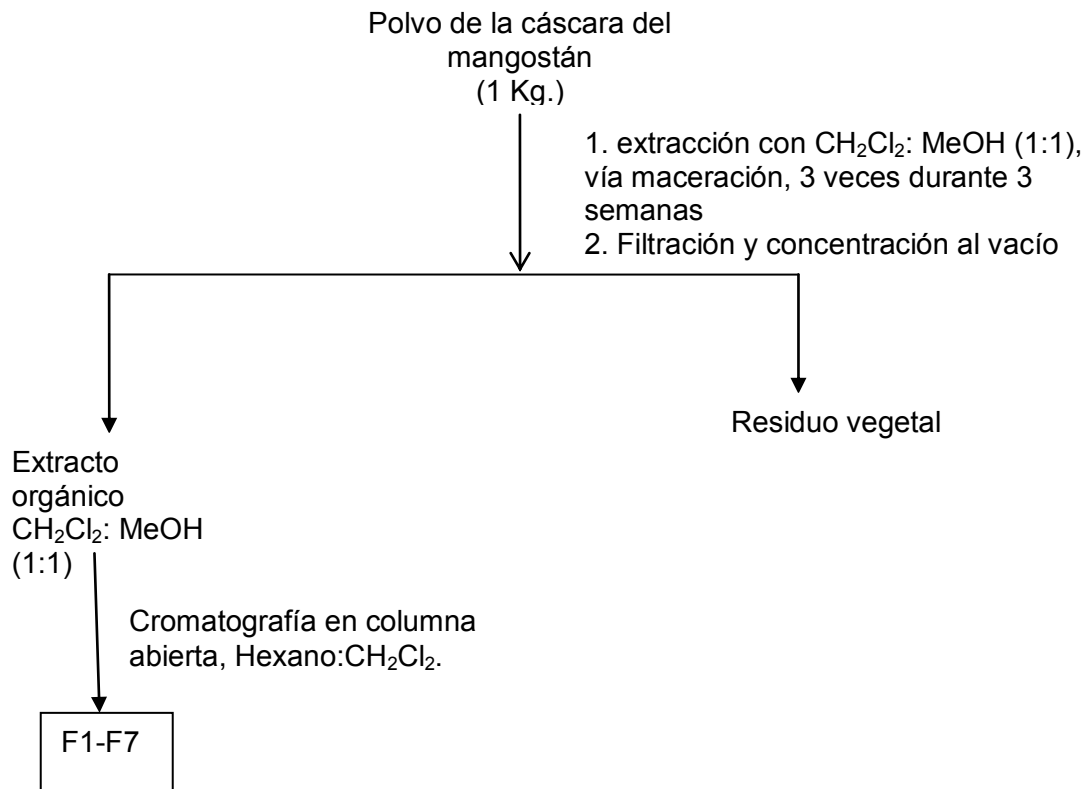


Fig. 32. Extracto crudo del mangostán, con un sistema de extracción CH_2Cl_2 : Metanol.

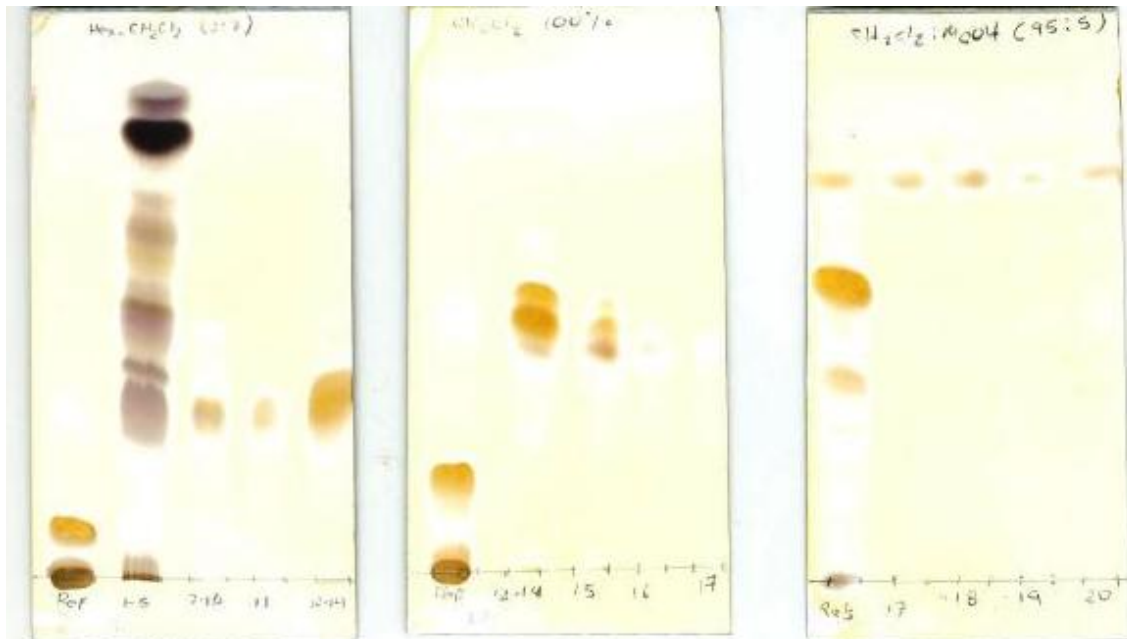
12.2 Fraccionamiento primario del extracto orgánico de *G. Mangostana* L.

Se fraccionaron 160 gramos del extracto íntegro en una columna abierta empacada con 4 litros de gel de sílice (proporción 1:10). Como fase móvil se utilizaron mezclas de CH_2Cl_2 -hexano en diversas proporciones (Tabla 12). Se recolectaron 51 fracciones de 800 mL cada una, las cuales se agruparon por sus características cromatográficas en 7 fracciones primarias F_1 - F_7 . Este proceso se resume en el esquema 1.



Esquema 1. Proceso de fraccionamiento y separación primario del polvo de la cáscara del mangostán.

Se realizó la reunión pertinente de las fracciones por el monitoreo de estas mediante cromatografía de placa fina (Fig. 33).



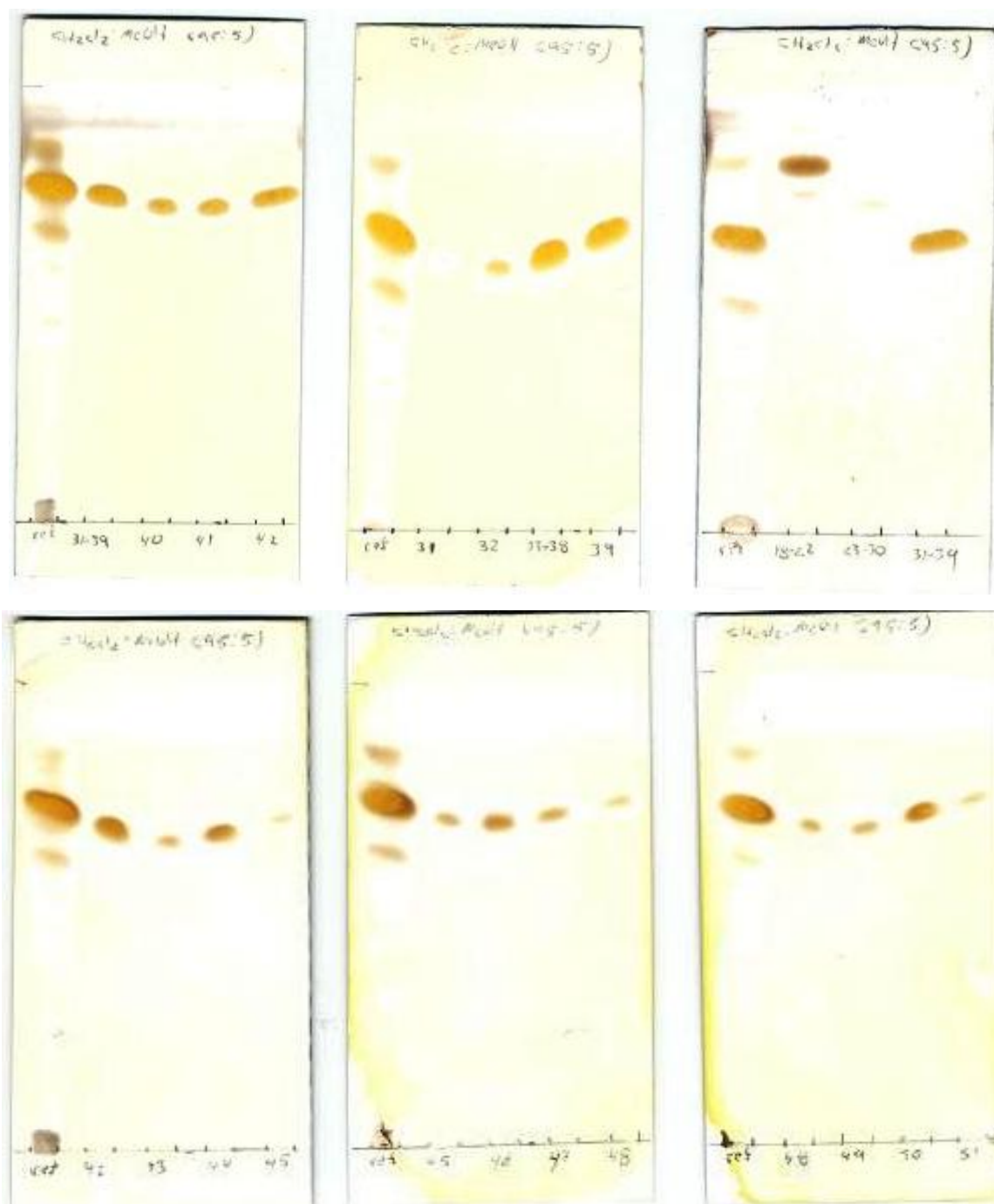


Fig. 33. Placas de cromatografía en placa fina (altura 10 cm.).

Después de este paso se procedió a concentrar a las fracciones hasta obtener polvos a los que posteriormente se les determino el punto de fusión y para compararlo con los puntos de fusión publicados en la literatura (Ji *et al.*, 2007; Ee *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2006).

Tabla 12. Proporción del sistema de elución usado para la separación de la α -mangostina

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave	Peso (g)	Punto de fusión (°C)
Hexano/CH ₂ Cl ₂	6:4	1-15	1-6	Fs1	0.1552	*
Hexano/CH ₂ Cl ₂	5:5	16-21	7-10	Fs2	0.4204	*
Hexano/CH ₂ Cl ₂	4:6	21-26	11-15	Fs3	2.4463	*
Hexano/CH ₂ Cl ₂	3:7	27-34	16-17	Fs4	0.7113	116-156
Hexano/CH ₂ Cl ₂	2:8	35-40	18-22	Fs5	0.8	153-155
Hexano/CH ₂ Cl ₂	1:9	41-44	23-30	Fs6	1.5194	*
CH ₂ Cl ₂	100	45-51	31-50	Fs7	31.5744	°179-180

°Fracción donde se obtuvo el α -mangostina. * No se tomó el punto de fusión de estas fracciones, puesto que no presentaban mancha en la placa cromatográfica.

A los polvos que presentaron puntos de fusión similares se les analizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), sus tiempos de retención (tomando como punto de detección a 320 nm), Además se les realizó el espectro al UV del rango de 220-400.

La α -mangostina se detectó en las fracciones 31-51. Por medio de los análisis realizados en cromatografía en placa fina y CLAR se comprobó la pureza del compuesto. Sólo se realizó la comparación con algunos parámetros informados en la literatura como tiempo de retención, punto de fusión y picos característicos al UV (Figs. 34 y 35) (Jung *et al.*, 2006; Ee *et al.*, 2006). Como última prueba se realizó un análisis de resonancia magnética nuclear protónica (RMNH) (Fig. 36), la cual se comparó con la informada en la bibliografía.

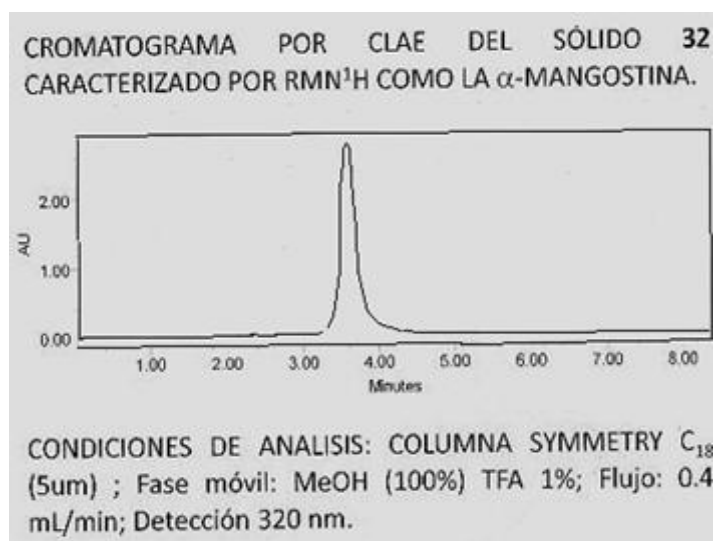


Fig. 34. Análisis del CLAR en el que se demuestra una señal y el tiempo de retención característico de la α -mangostina a 320 nm.

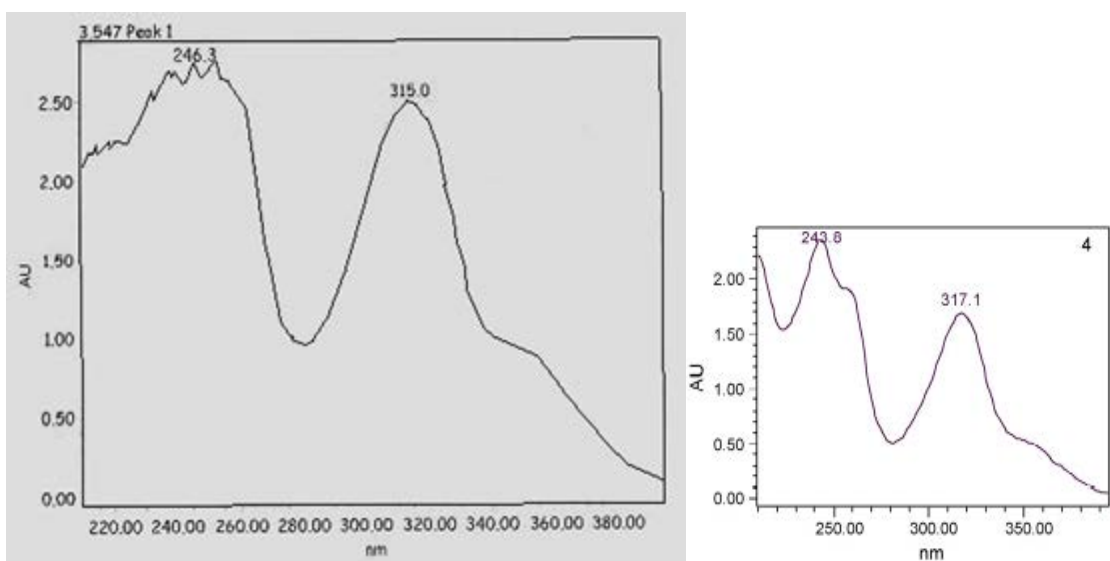


Fig. 35. Análisis del espectro al UV de la α -mangostina obtenida (primer gráfica). En la parte izquierda se presenta a la grafica obtenida de la literatura (Ji *et al.*, 2007) y es presentada para comparar con la obtenida en este trabajo.

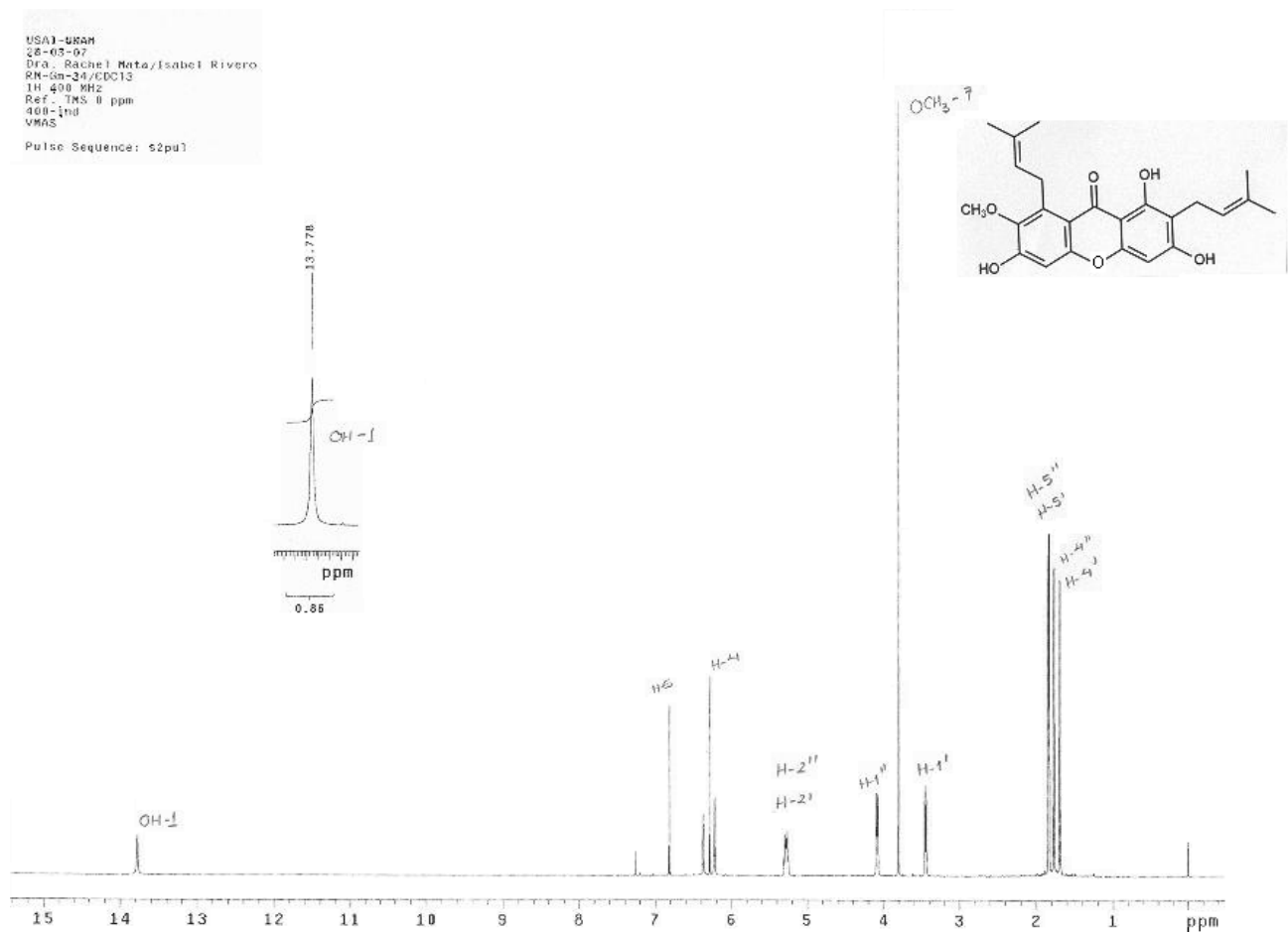


Fig. 36. Espectro de la α -mangostina por RMNH. Se muestran los picos característicos descritos en la literatura (Ee *et al.*, 2006).

Resumen

La α - mangostina se obtuvo de las fracciones 31-51 como un polvo amarillo amorfo con un rendimiento de 3.15%, con un punto de fusión de 179-180°C. Los análisis cromatográficos permitieron determinar la pureza del compuesto; así mismo, la CLAR reveló un tiempo de retención 3.5 minutos, usando una columna simétrica C₁₈; con una fase móvil de MeOH (100%), TFA al 1% y con un flujo de 0.4 mL/min.

En el barrido espectrofotométrico al UV, se obtuvieron dos picos de longitud máxima bien definidos en 246.3 y 315 nm. Por medio del análisis de RMNH se encontraron señales características de las de la alfa mangostina como las descritas por Ee *et al.* (2006) en δ 13.8, δ 6.8, δ 6.25, δ 5.25, δ 4.10, δ 3.8, δ 3.40, δ 1.8, 2, δ 1.79 y δ 1.65.

El análisis comparativo de las constantes físicas y espectroscópicas obtenidas en el presente estudio, con las reportadas en la literatura (Jung *et al.*, 2006; Ee *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2007) confirman la identidad de la α -mangostina.

12. Referencias

- Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. **2007**. Wilson's disease. *Lancet* 369: 397-408.
- Agon VV, Bubb WA, Wright A, Hawkins CL, Davies MJ. **2006**. Sensitizer-mediated photooxidation of histidine residues: Evidence for the formation of reactive side-chain peroxides. *Free Radic Biol Med* 40:698-710.
- Aruoma OI. **1996**. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radic Biol Med* 20:675-705.
- Aruoma OI Halliwell B. **1987**. Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. *Biochem J* 248:973-976.
- Balasubramanian K, Rajagopalan K. **1988**. Xanthones from *Garcinia mangostana*, structures of BR-xanthone-A and BR-xanthone-B. *Phytochemistry* 27:1552-1554.
- Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. **1994**. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol* 233:229-240.
- Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, Allen KL, Carney JM. **1997**. Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:674-678.
- Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverrí J. **2005**. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17:164-173.
- Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. **2005**. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J Ethnopharmacol* 101:330-333.
- Chopra RN, Nayar SL, Chopra IC. **1956**. Glossary of Indian medicinal plants. The National Institute of Science Communication and Information resources. Nueva Dehli. 123.
- Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J. **1998**. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr* 80:77-112
- Ee GC, Daud S, Taufiq-Yap YH, Ismail NH, Rahmani M. **2006**. Xanthones from *Garcinia mangostana* (Guttiferae). *Nat Prod Res* 20:1067-1073.
- Florian-Sánchez E, Villanueva C, Medina-Campos ON, Rocha D, Sánchez-González DJ, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverrí J. **2006**. Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic Res* 40:523-533.

- Fotie J, Nkengfack AE, Rukunga G, Tolo F, Peter MG, Heydenreich M, Fomum ZT. **2003**. In-vivo antimalarial activity of some oxygenated xanthenes. *Ann Trop Med Parasitol* 97:683-688.
- Garcia VV, Magpantay TO, Escobin LD. **2005**. Antioxidant potential of selected Philippine vegetables and fruits. *Philipp Agric Sci* 88:78-83.
- Garrity AR, Morton GA, Morton JC. Mayo 4, **2004**. Nutraceutical mangosteen composition. *United States Patent*, US 6,730,333 B1.
- Garnett M, Sturton SD. **1932**. Garcinia Mangostana in the treatment of amoebic dysentery. *Chin Med J* 46:969-973.
- Gomes A, Costa D, Lima JL, Fernández E. **2006**. Antioxidant activity of beta-blockers: An effect mediated by scavenging reactive oxygen and nitrogen species? *Bioorg Med Chem* 14:4568–4577.
- Gopalakrishnan G, Banumathi B, Suresh G. **1997**. Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from Garcinia mangostana and their synthetic derivatives. *J Nat Prod*. 60:519-524.
- Gopalakrishnan C, Shankaranarayanan D, Kameswaran L, Nazimudeen SK. **1980**. Effect of mangostin, a xanthone from Garcinia mangostana Linn. in immunopathological & inflammatory reactions. *Indian J Exp Biol* 8:843-846.
- Gupte A, Mumper RJ. **2007**. An investigation into copper catalyzed D-penicillamine oxidation and subsequent hydrogen peroxide generation. *J Inorg Biochem* 101:594-602.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. **1999**. Free radicals in biology and medicine, 3^{era} ed. Oxford. Nueva York, EUA.
- Harwood DT, Kettle AJ, Winterbourn CC. **2006**. Production of glutathione sulfonamide and dehydroglutathione from GSH by myeloperoxidase derived oxidants and detection using a novel LC-MS/MS method. *Biochem J* 399:161-168.
- Hawkins DJ, Kridl JC. **1998**. Characterization of acyl-ACP thioesterases of mangosteen (Garcinia mangostana) seed and high levels of stearate production in transgenic canola. *Plant J* 13:743-52.
- Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. **2000**. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 15:1456-1462.
- Huang YL, Chen CC, Chen YJ, Huang RL, Shieh BJ. **2001**. Three xanthenes and a benzophenone from Garcinia mangostana. *J Nat Prod* 64:903-906.
- Leong LP, Shui G. **2002**. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem* 76:69–75.
- Lin CN, Hsieh HK, Liou SJ, Ko HH, Lin HC, Chung MI, Ko FN, Liu HW, Teng CM. **1996**. Synthesis and antithrombotic effect of xanthone derivatives *J Pharm Pharmacol* 9:887-890.

Linuma M, Tosa H, Tanaka T, Asai F, Kobayashi Y, Shimano R, Miyauchi K. **1996**. Antibacterial activity of xanthenes from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol* 48:861-865.

Linster CL, Van Schaftingen E. **2007**. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J* 274:1-22.

Long LH, Evans PJ, Halliwell B. **1999**. Hydrogen peroxide in human urine: Implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 262:605-609.

Lozoya X. **1993**. Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI. En: la investigación de la herbolaria Medicinal Mexicana. *Secretaría de Salud México*. 255-270.

Jenner A, England TG, Aruoma OI, Halliwell B. **1998**. Measurement of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry: ethanethiol prevents artifactual generation of oxidized DNA bases. *Biochem J* 331:365-369.

Ji X, Avula B, Khan IA. **2007**. Quantitative and qualitative determination of six xanthenes in *Garcinia mangostana* L. by LC-PDA and LC-ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal* 43:1270-1276.

Jiang DJ, Hu GY, Jiang JL, Xiang HL, Deng HW, Li YJ. **2003**. Relationship between protective effect of xanthone on endothelial cells and endogenous nitric oxide synthase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 11:5171-5177.

Jinsart W, Ternai B, Buddhasukh D, Polya GM. **1992**. Inhibition of wheat embryo calcium-dependent protein kinase and other kinases by mangostin and gamma-mangostin. *Phytochemistry* 31:3711-3713.

Jung HA, Su BN, Keller WJ, Mehta RG, Kinghorn AD. **2006**. Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J Agric Food Chem* 54:2077-2082.

Kawai Y, Kiyokawa H, Kimura Y, Kato Y, Tsuchiya K, Terao J. **2006**. Hypochlorous acid-derived modification of phospholipids: characterization of aminophospholipids as regulatory molecules for lipid peroxidation. *Biochemistry* 45:14201-14211.

M'bemba-Meka P, Lemieux N, Chakrabarti SK. **2007**. Role of oxidative stress and intracellular calcium in nickel carbonate hydroxide-induced sister-chromatid exchange, and alterations in replication index and mitotic index in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol* 81:89-99.

Mahabusarakam W, Proudfoot J, Taylor W, Croft K. **2000**. Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthenes derived from mangostin. *Free Radic Res* 33:643-659.

Maldonado PD, Rivero-Cruz I, Mata R, Pedraza-Chaverri J. **2005**. Antioxidant activity of A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum* (Geraniaceae). *J Agric Food Chem* 53:1996-2001.

Eberhardt M K. **2001**. Reactive oxygen metabolites, chemistry and medical consequences. *Crc. Florida, USA* 10-149.

Marcason W. **2006**. What are the facts and myths about mangosteen? *J Am Diet Assoc* 106:986.

Matsumoto K, Akao Y, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y. **2005**. Xanthenes induce cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer DLD-1 cells. *Bioorg Med Chem* 13:6064-6069.

Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y. 2003. Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukemia cell lines. *J Nat Prod* 8:1124-1127.

Ministerio de salud pública. Cuba. **2001**. Antioxidantes y estrés oxidativo. *Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos*. Consultado el 4 de julio del 2007, en la página <http://www.inha.sld.cu/Documentos/Dieta%20y%20Antioxidantes.doc>.

Moongkarndi P, Kosem N, Luanratana O, Jongsomboonkusol S, Pongpan N. **2004**. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia* 75:375-377.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. **2007**. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424.

Pedraza-Chaverrí J, Medina-Campos ON, Segoviano-Murillo S. **2007**. Effect of heating on peroxynitrite scavenging capacity of garlic. *Food Chem Toxicol* 45:622-627.

Pierce S C. **2003**. A Thai herbal, Traditional recipes for health and harmony. Findhorn Press. Scotland, Finland 118.

Pinto MM, Sousa ME, Nascimento MS. **2005**. Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Curr Med Chem* 12:2517-2538.

Peres V, Nagem TJ, de Oliveira FF. **2000**. Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. *Phytochemistry* 55:683-710.

Riscoe M, Kelly JX, Winter R. **2005**. Xanthenes as antimalarial agents: discovery, mode of action, and optimization. *Curr Med Chem* 12:2539-2549.

Sahu SC, Ruggles DI, O'Donnell MW. **2006**. Prooxidant activity and toxicity of nordihydroguaiaretic acid in clone-9 rat hepatocyte cultures. *Food Chem Toxicol* 10:1751-1757.

Schnackenberg CG. **2002**. Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:335-342.

Sen AK, Uusvuori R, Hase TA, Benerji N, Sarkar KK, Mazumder PC. **1980**. A xanthone from *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* 19:2223-2225.

Serrano E, Pozo OJ, Beltrán J, Hernández F, Font L, Miquel M, Aragon CM. **2007**. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of (4S,2RS)-2,5,5-trimethylthiazolidine-4-carboxylic acid, a stable adduct formed between D-(-)-penicillamine and acetaldehyde (main biological metabolite of ethanol), in plasma, liver and brain rat tissues. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21:1221-1229.

Suksamrarn S, Suwannapoch N, Phakhodee W, Thanuhiranlert J, Ratananukul P, Chimnoi N, Suksamrarn A. **2003**. Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull* 51:857-859.

Suksamrarn S, Komutiban O, Ratananukul P, Chimnoi N, Lartpornmatulee N, Suksamrarn A. **2006**. Cytotoxic prenylated xanthenes from the young fruit of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull* 54:301-305.

Vieira LM, Kijjoa A. **2005**. Naturally-occurring xanthenes: recent developments. *Curr Med Chem* 12:2413-2446.

Weecharangsan W, Opanasopit P, Sukma M, Ngawhirunpat T, Sotanaphun U, Siripong P. **2006**. Antioxidative and neuroprotective activities of extracts from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.). *Med Princ Pract* 15:281-287.

Whiteman M, Rose P, Siau JL, Cheung NS, Tan GS, Halliwell B, Armstrong JS. **2005**. Hypochlorous acid-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human hepatoma HepG2 and human fetal liver cells: role of mitochondrial permeability transition. *Free Radic Biol Med* 38:1571-1584.

Williams P, Ongsakul M, Proudfoot J, Croft K, Beilin L. **1995**. Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. *Free Radic Res* 23:175-184.

Winterbourn CC. **2002**. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology* 27:223-227.

Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ. **2006**. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *J Biol Chem* 281:39860-39869.

Woo S, Jung J, Lee C, Kwon Y, Na Y. **2007**. Synthesis of new xanthone analogues and their biological activity test cytotoxicity, topoisomerase II inhibition, and DNA cross-linking study. *Bioorg Med Chem Lett* 17:1163-1166.

Yap YW, Whiteman M, Cheung NS. **2007**. Chlorinative stress: an under appreciated mediator of neurodegeneration? *Cell Signal* 19:219-228.

Yoshikawa M, Harada E, Miki, A, Tsukamoto K, Si Qian Liang, Yamahara J., Murakami N. **1994**. Antioxidant constituents from the fruit hulls of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) originating in Vietnam. *J Pharm Society of Japan* 114:129-133.

Xiong Y, Rabchevsky AG, Hall ED. **2007**. Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J Neurochem* 100:639-649.