

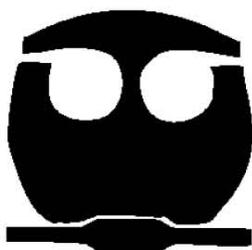


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CAPACIDAD ATRAPADORA DE
RADICALES HIDROXILO
DEL MANGOSTÁN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A:
SONIA VICTORIA MARES



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El jurado asignado:

PRESIDENTE: José Pedraza Chaverri
VOCAL: Perla Carolina Castañeda López
SECRETARIO: María del Socorro Cecilia Reyna Rodríguez

1er. SUPLENTE: Eleazar Martínez Barajas
2do. SUPLENTE: Ma. de los Angeles Granados Silvestre

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 209, 2° piso, edificio F de la Facultad de Química de la UNAM, México D.F.

Este trabajo recibió apoyo de DGAPA (Proyecto PAPIIT No. IN207007).

Dr. José Pedraza Chaverri
Asesor de tema

M. en C. Omar Noel Medina Campos
Supervisor técnico

Sonia Victoria Mares
Sustentante

ÍNDICE

Página

	1
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Generación de las especies reactivas del oxígeno (ERO)	3
1.1.1 Estructura, formación e importancia del oxígeno en los sistemas vivos	3
1.1.2 Radical libre	3
1.1.3 Toxicidad del oxígeno y su función como precursor del las ERO	4
1.1.4 Clasificación de las ERO	5
1.1.4.1 Radicales	6
1.1.4.1.1 Reacción de Fenton y ciclo de Haber-Weiss	7
1.1.4.2 No radicales	8
1.2 Importancia del radical hidroxilo (OH [•])	9
1.3 Fuentes generadoras de ERO	9
1.4 Estrés oxidativo	10
1.5 Efecto de las ERO sobre las macromoléculas	11
1.5.1 Daño oxidativo a proteínas	11
1.5.2 Daño oxidativo a lípidos	12
1.5.3 Daño oxidativo al ADN	12
1.6 Enfermedades asociadas a las ERO	13
1.7 Sistemas de defensa antioxidante	14
1.7.1 Antioxidantes enzimáticos	14
1.7.2 Antioxidantes no enzimáticos	15
1.8 <i>Garcinia mangostana</i> y XanGo™	18
2. JUSTIFICACIÓN	22

3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVOS	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Reactivos	24
5.2 Preparación de las muestras	24
5.3 Evaluación de la capacidad atrapadora sobre el radical OH [•]	25
5.4 Ensayo	25
5.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	26
5.6 Análisis estadístico	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
6.1 Implementación de la técnica de electroforesis	27
6.2 Generación del sistema de reacción	28
6.3 Evaluación antioxidante del extracto acuoso del mangostán	28
6.4 Evaluación antioxidante de XanGo™	30
6.5 Evaluación antioxidante del compuesto de referencia: DMSO	34
6.6 Análisis estadístico de la capacidad antioxidante	36
7. CONCLUSIONES	37
8. APÉNDICE	38
9. ABREVIATURAS	40
10. REFERENCIAS	41

RESUMEN.

Durante miles de años, el hombre ha buscado la manera de sanar o en todo caso aminorar padecimientos que lo aquejan, de este modo ha recurrido a la utilización de elementos que se encuentran en la naturaleza como lo son las plantas, de las cuales se derivan una amplia variedad de compuestos químicos que son empleados para la elaboración de medicamentos que hoy en día ayudan a combatir enfermedades.

Tal es el caso de la fruta de la especie *Garcinia mangostana* conocida con el nombre de mangostán la cual desde hace muchos años se ha empleado en la medicina tradicional como agente de curativo; esta fruta es originaria del Sudeste de Asia, específicamente en las islas de las Indias Orientales. Asimismo, de acuerdo a investigaciones científicas, se ha descubierto que posee una amplia gama de compuestos biológicamente activos denominados xantonas, las cuales entre muchas otras propiedades posee la de ser antioxidante.

En un principio las reacciones en las que participaban los radicales libres estuvieron fuera del ámbito de la medicina y de la biología, sólo algunos profesionales estuvieron interesados en este campo; pero hoy en día en investigaciones realizadas a través de los años se ha encontrado que estos radicales libres están presentes en forma directa e indirecta con algunas enfermedades que aquejan al humano, por lo que a últimas fechas han tomando gran importancia dentro del ámbito de la salud, ya que continuamente estamos expuestos a estos compuestos, siendo las mas importantes las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

En este trabajo se utilizó un jugo comercial cuyo nombre es XanGo™ y uno de sus ingredientes principales es la fruta del mangostán, por lo que se evaluó la capacidad para atrapar *in vitro* el radical hidroxilo (OH•), el cual es considerado una de las especies oxidantes más dañinas por su alta reactividad, y que ha sido relacionado con diversas enfermedades como por ejemplo la artritis reumatoide, enfermedad de Parkinson, Alzheimer, entre otras.

Al mismo tiempo se evaluó el extracto acuoso del polvo de la cáscara de la fruta de mangostán, y el dimetilsulfóxido (DMSO), un compuesto que posee la capacidad de atrapar OH•.

Se empleó para este estudio la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) con el fin de medir la capacidad de los tres compuestos para atrapar OH•, exponiendo la albúmina sérica bovina (ASB) a la presencia de este radical, el cual se generó mediante la reacción de Fenton.

En el análisis electroforético se encontró que el extracto acuoso del polvo de la cáscara de mangostán ($CI_{50} = 0.486 \pm 0.006$ mg/ml, $n = 4$) tiene la misma capacidad de atrapar OH^\bullet que el jugo comercial XanGo™ ($CI_{50} = 0.628 \pm 0.085$ mg/ml, $n = 5$), sin embargo el mejor compuesto es el DMSO ($CI_{50} = 0.058 \pm 0.003$ mg/ml, $n = 4$).

Los resultados derivados de este proyecto permiten establecer que el extracto acuoso del polvo de la cáscara de mangostán protege a la ASB del daño por OH^\bullet (94% de protección).

1. ANTECEDENTES.

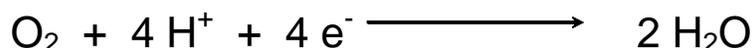
1.1 Generación de las especies reactivas del oxígeno (ERO).

1.1.1 Estructura, formación e importancia del oxígeno en los sistemas vivos.

El oxígeno molecular (O₂) o dioxígeno es uno de los gases más importantes de la Tierra, constituye el 21% de la atmósfera, 89% del peso del agua del mar y al menos el 47% de la corteza terrestre [Cárdenas y Pedraza, 2006].

El oxígeno en su estado basal o de triplete es un birradical, tiene dos únicos electrones desapareados (que no están unidos entre sí, sino por un enlace covalente), estos electrones se encuentran en orbitales diferentes (en el orbital π^* -pi antienlace-), pero con espines paralelos; estas características hacen que le sea difícil tomar dos electrones libres con giro antiparalelo, por lo que solo recibe electrones de uno en uno para cada orbital molecular externo [Mathews *et al.*, 2002].

La mayor parte del oxígeno que utiliza el humano es reducido a agua por la acción del complejo citocromo oxidasa (complejo IV) (Figura 1), que es el último complejo de transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, según la siguiente reacción global:



1.1.2 Radical libre.

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

Tabla 1. Diferentes formas de generar radicales libres.

$\text{X} \longrightarrow \text{e}^- + \text{X}^{\bullet+}$	Radical formado por la pérdida de un electrón de un no radical.
$\text{Y} + \text{e}^- \longrightarrow \text{Y}^{\bullet-}$	Radical formado por la ganancia de un electrón de un no radical.
$\text{A:B} \longrightarrow \text{A} + \text{B}^{\bullet}$	Radicales formados por la ruptura homolítica de una molécula.

1.1.3 Toxicidad del oxígeno y su función como precursor de las ERO.

El oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aerobios, pero a altas concentraciones, o bajo ciertas condiciones, a concentración normal llega a ser tóxico, situación conocida como paradoja del oxígeno.

La toxicidad del oxígeno se puede explicar por la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales suelen ser más reactivas que el oxígeno en su estado basal de triplete [Hansberg, 2002]. En la Figura 1 se muestra la producción de las ERO mediante la reducción univalente del O_2 .

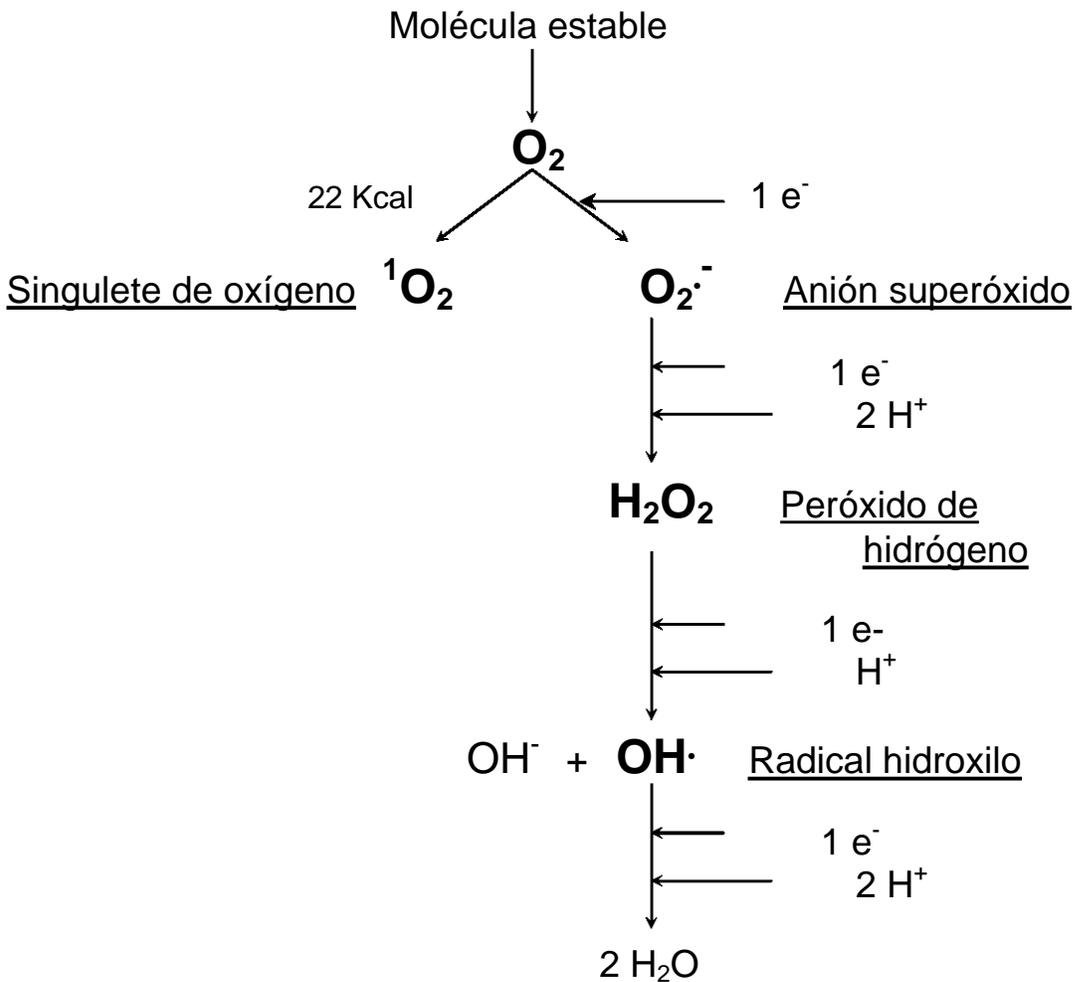


Figura 1. Esquema de la producción de ERO a través de la reducción univalente del O_2 .

Sin embargo, la cadena respiratoria es la principal fuente de producción de ERO. En la Figura 2 se muestra la cadena transportadora de electrones y la producción de ERO, además la defensa antioxidante de la célula [Jezek y Hlavatá, 2005].

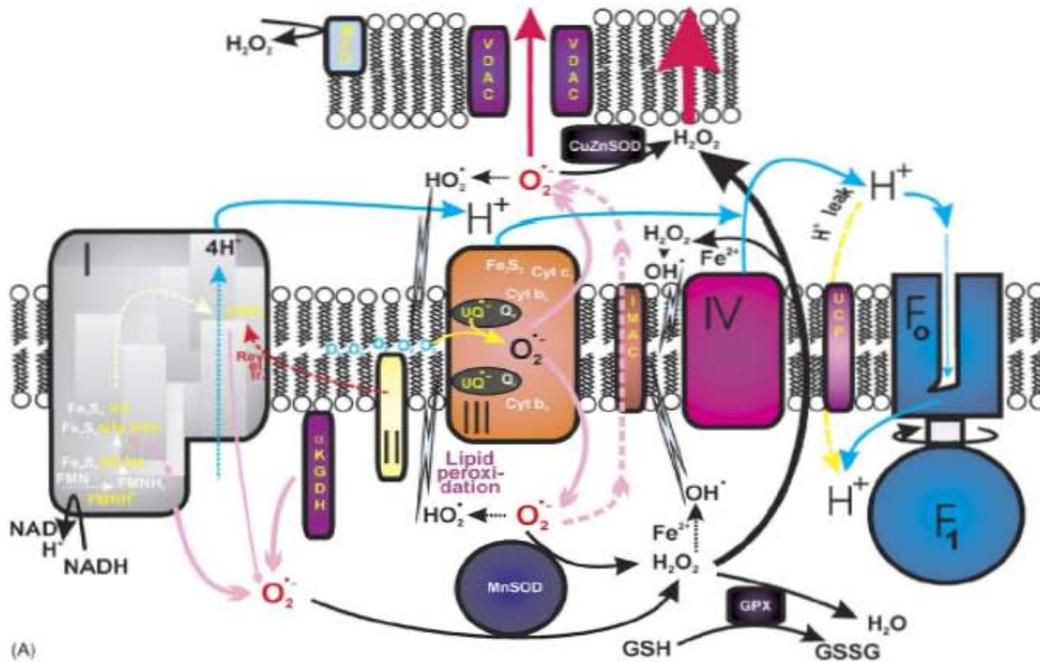


Figura 2. Cadena transportadora de electrones y la formación de ERO.

Las ERO tienen funciones importantes para la célula como:

- Participar en la quimiotaxis,
- En la destrucción de bacterias invasoras por fagocitos,
- En la biosíntesis de moléculas y
- En la regulación de apoptosis.

1.1.4 Clasificación de las ERO.

Las ERO se dividen en dos grupos importantes: los radicales y los no radicales.

1.1.4.1 Radicales.

- Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$).

Se produce cuando el oxígeno acepta un electrón, es una especie inestable y se encuentra en equilibrio con su ácido conjugado (radical hidroperoxilo), tiene muy baja solubilidad, por lo que no difunde lejos de donde se produce.

Participa en la descarga respiratoria (aumento súbito del consumo de oxígeno) de los fagocitos activados, en donde la NADPH oxidasa reduce parcialmente el oxígeno de la siguiente forma:



De igual manera la xantina oxidasa (XO) es capaz de reducir al oxígeno para dar el anión radical superóxido de acuerdo a la siguiente reacción [Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006]:

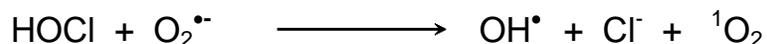


- Radical hidroxilo (OH^{\bullet}).

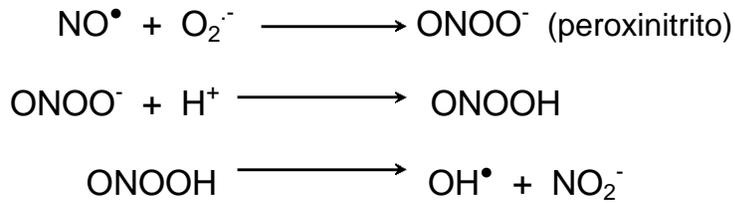
Es considerado una de las especies oxidantes mas dañinas por su alta reactividad (y por lo tanto su vida media es muy corta), por lo que reacciona cerca de los sitios en donde se produce.

El OH^{\bullet} puede reaccionar con distintas macromoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos principalmente) [Ríos, 2003; Cao *et al.*, 2003].

La formación de este radical puede darse a partir del ácido hipocloroso:



La formación del OH^{\bullet} también ocurre en la reacción entre el radical $O_2^{\bullet-}$ y el óxido nítrico que es un radical vasodilatador producido por muchas células [Cao *et al.*, 2003], como se muestra a continuación:



Además se forma por reacciones ionizantes sobre el agua:



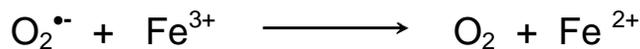
También se genera fácilmente por la reacción de Fenton y de Haber-Weiss, como se describe a continuación.

1.1.4.1.1 Reacción de Fenton y ciclo de Haber-Weiss.

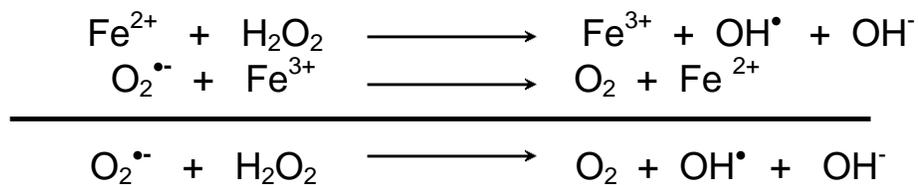
El H_2O_2 en presencia de metales de transición como Cu^{2+} o Fe^{2+} da lugar a la reacción de Fenton con la consecutiva formación del OH^\bullet [Stadtman y Berlett, 1991].



Por otro lado, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ favorece la producción de Fe^{2+} , como se muestra en la siguiente reacción:



El conjunto de estas reacciones constituye el ciclo de Haber-Weiss [Halliwell y Gutteridge, 1999]:



1.1.4.2 No radicales.

- Oxígeno singulete (1O_2) forma $^1\Delta$.

Se forma por la inversión en el espín de uno de los electrones desapareados en un orbital molecular externo de la molécula de oxígeno.

La formación de este no radical se lleva a cabo por fagocitos activados, que liberan enzimas (como proteasas) y producen ERO para combatir el daño ocasionado por agentes extraños. Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes [Eberhardt, 2001] :



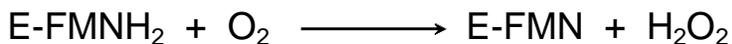
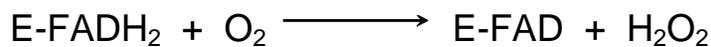
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Es un oxidante débil y difunde a través de las membranas biológicas ya que tiene una gran lipofiliidad. Es producido mediante dos tipos de reacciones:

- a) Por la SOD según la siguiente reacción:



- b) En el metabolismo de los aminoácidos a través de un grupo de flavoenzimas localizadas en el retículo endoplásmico del hígado y riñón, de acuerdo a las siguientes reacciones [Cárdenas y Pedraza, 2006] :



1.2 Importancia del radical hidroxilo (OH•).

El OH• es una de las especies más agresivas de las ERO, debido a su alta reactividad. Su vida media corta es de 10^{-9} s y esto hace difícil detectarlo en forma directa en sistemas vivos [Bensasson *et al.*, 1993].

Es un poderoso agente modificador de proteínas, especialmente de la estructura primaria y en consecuencia, de las estructuras secundaria y terciaria, en comparación con el $O_2^{\bullet-}$ que suele ser relativamente inactivo.

La combinación de las especies $OH^{\bullet} + O_2^{\bullet-} + O_2$ puede causar sólo fragmentación de la proteína, en contraste con el efecto del OH• que causa desnaturalización [Davies y Delsignore, 1987].

La presencia de este radical no siempre implica daño, ya que también es un buen regulador que ayuda a mantener la homeostasis en la célula y salud de los tejidos, pero cuando se genera en exceso y la defensa antioxidante de la célula es deficiente, este radical interacciona con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos causando daño y en algunos casos enfermedades [Cheng *et al.*, 2002].

Este radical juega un papel directo e indirecto en diferentes patologías [Cheng *et al.*, 2002; Zeitz *et al.*, 2002], de las cuales podemos mencionar:

- Isquemia cerebral
- Parkinson
- Artritis reumatoide
- Enfermedades cardiovasculares
- Carcinogénesis
- Apoplejía

1.3 Fuentes generadoras de ERO.

Existen diversas formas de generación de las ERO, pero la mitocondria es la fuente principal debido a la cadena de transporte de electrones, en donde las especies $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y OH• son producidas en forma sucesiva por medio de la reducción univalente del oxígeno.

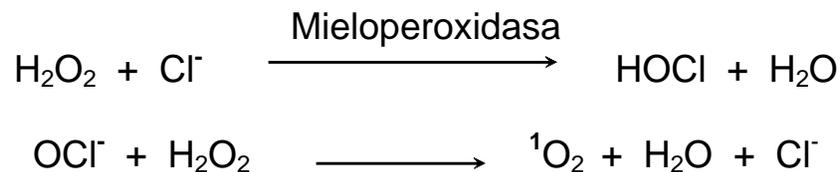
Cuando existe la presencia de agentes infecciosos, ciertas células del sistema inmune muestran un rápido consumo de oxígeno (“el llamado estallido respiratorio”), lo cual provoca la generación de especies oxidantes que son utilizados como sistema de defensa antimicrobiano, diseñado a destruir microorganismos invasores [Chaible *et al.*, 2005].

En este proceso intervienen varias enzimas como la NADPH localizada en la membrana citoplasmática de los fagocitos que al transferir un electrón al O₂ produce el radical O₂^{•-}, cuya reacción se vio anteriormente en la generación del anión superóxido.

El O₂^{•-} se libera en el interior del fagolisosoma para luego ser dismutado a H₂O₂ por la SOD, según la siguiente reacción:



Este H₂O₂ generado reacciona con la mieloperoxidasa que también se encuentra en la membrana citoplasmática de los fagocitos y que en presencia de halógenos principalmente el cloro, forma ácido hipocloroso (HOCl), a partir de éste se puede formar el singulete de oxígeno (¹O₂) según las siguientes reacciones:



El HOCl es un poderoso agente que destruye a las bacterias en segundos gracias a las reacciones de halogenación y oxidación que produce [Winterbourn *et al.*, 2006; Roos *et al.*, 2003].

1.4 Estrés oxidativo.

Como se ha señalado anteriormente, la generación de radicales libres no es del todo perjudicial ya que el sistema de defensa del cuerpo los genera para mantenerlo libre de agentes extraños como virus, bacterias, hongos, etc.

Pero cuando se pierde el equilibrio entre condiciones oxidantes y defensas antioxidantes y la generación de ERO sobrepasa la capacidad de neutralización, sobreviene una etapa denominada estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se define como un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis de óxido-reducción intracelular, es decir, el balance entre prooxidantes y antioxidantes a favor de los prooxidantes. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo a daño en la célula y en ocasiones a muerte celular.

1.5 Efecto de las ERO sobre las macromoléculas.

Cuando existe una excesiva producción de ERO y el sistema de defensa (mecanismos antioxidantes) es deficiente provoca daño oxidativo y puede alterar muchas macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que implica que la célula sufra modificaciones estructurales, mutaciones e incluso muerte celular.

A continuación se detalla como afectan la producción de ERO a cada una de esta macromoléculas y las consecuencias que implica.

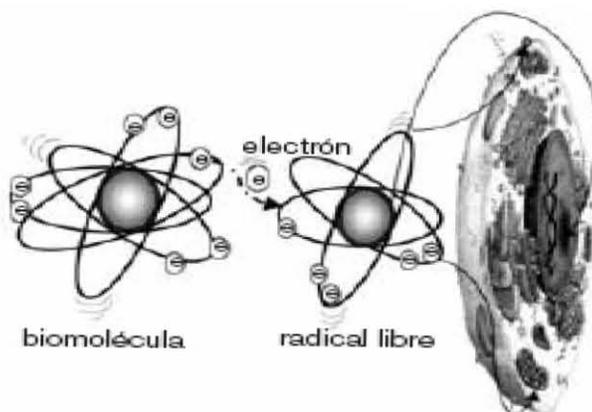


Figura 3. Interacción de radicales libres con biomoléculas.

1.5.1 Daño oxidativo a proteínas.

El efecto de las ERO sobre las proteínas es uno de los aspectos más críticos del estrés oxidativo ya que puede causar la pérdida de la actividad catalítica de enzimas (afectando el proceso de respiración celular), daños en la integridad de proteínas estructurales (fragmentación de la proteína, entrecruzamientos de cadenas peptídicas) o interrumpir la regulación de las vías metabólicas.

Se oxidan preferentemente los residuos de fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina y como consecuencia la formación de grupos carbonilo que impiden el normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc.).

El sistema de reparación de las proteínas sólo se limita a los residuos de metionina, por lo que las proteínas oxidadas deben ser hidrolizadas para evitar su difusión en la red metabólica o su interacción con otras proteínas [Velázquez *et al.*, 2004].

1.5.2 Daño oxidativo a lípidos.

El efecto principal de las ERO sobre lípidos (que son el grupo mas susceptible debido a la presencia de dobles enlaces en su estructura y además por constituir de manera fundamental el organelo celular mas expuesto que es la membrana celular) es la lipoperoxidación.

La lipoperoxidación es una serie de reacciones en cadena y ocurre cuando un lípido es expuesto a un agente oxidante como una ERO, como consecuencia se forma un RL que oxida una cadena insaturada de lípido, y de esta manera la formación de un lípido hidropoxidado y un radical alquilo. El alquilo reacciona con una molécula de oxígeno y regenera la especie inicial, esta reacción se repite consecutivamente.

La lipoperoxidación trae como consecuencia:

- Alteraciones en la estructura de la membrana, afectando la fluidez y provocando daño en su integridad.
- Generación de especies citotóxicas como malondialdehído y 4-hidroxi-2-nonenal que funcionan como agentes electrofílicos y que son capaces de interactuar con proteínas y ADN [Velázquez *et al.*, 2004; Mathews *et al.*, 2002].

1.5.3 Daño oxidativo al ADN.

La interacción de las ERO con el ADN provoca reacciones con las bases nitrogenadas causando cambios conformacionales, alteración de bases y ruptura de una o de la doble cadena y pérdida de nucleótidos. Esto conduce a la producción de genes mutados y, por ende, de proteínas disfuncionales.

De igual manera, la presencia de las ERO hace que se fragmente el ADN y provoca la generación de segmentos internucleosomales, formados por la ruptura de ADN entre los nucleosomas (estructuras fundamentales para la organización del ADN dentro de los cromosomas), ocasionando con ello alteraciones en las propiedades funcionales de la cromatina, la cual juega un papel importante en la regulación de la transcripción genética [Velázquez *et al.*, 2004].

El daño oxidativo al ADN es de suma importancia ya que las bases nitrogenadas dañadas pueden generar mutaciones y que a su vez puede resultar en carcinogénesis, apoptosis, necrosis y enfermedades hereditarias [Rodríguez *et al.*, 2001].

1.6 Enfermedades asociadas a las ERO.

Como ya se mencionó anteriormente el daño oxidativo puede lesionar muchas biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que conlleva a la producción de lesiones tisulares y de esta manera a la generación de diversas enfermedades. En algunas investigaciones se ha encontrado que cierto tipo de enfermedades están asociadas con la presencia de las ERO.

Se conocen más de 100 enfermedades en las que están implicados los RL, en algunas son la causa primaria y en otras aumenta las complicaciones clínicas (causa secundaria). Algunas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo son [Ferrer *et al.*, 1999]:

- Enfermedad de Alzheimer.

Se caracteriza por la disminución progresiva de la función cognitiva y asociada con una pérdida neuronal masiva. En estos pacientes se observa un aumento significativo de los niveles de lipoperoxidación y en los niveles de 4-hidroxinonenal [Kawamoto *et al.*, 2005; Velázquez *et al.*, 2004].

- Enfermedad de Parkinson.

Se caracteriza por temblor de reposo, bradiquinesia (lentitud en los movimientos voluntarios), rigidez e inestabilidad en el equilibrio y se debe a la destrucción de neuronas que contienen neuromelanina, la cual es mas vulnerable al ataque de ROS cuando existen niveles bajos de glutatión y vitamina E, y niveles altos de hierro libre (prooxidante) [Glaser *et al.*, 2005; Velázquez *et al.*, 2004].

- Esclerosis lateral amiotrófica.

Es una enfermedad neurodegenerativa que comienza afectando las neuronas motoras superiores e inferiores que se manifiesta como una debilidad progresiva en miembros y cara, atrofia, espasticidad, reflejos hiperactivos y finalmente compromiso respiratorio y muerte. Aproximadamente un 10% de los casos se heredan de manera autosómica dominante, en los que tienen mutaciones en el gen CuZnSOD, mutación que causa un aumento en la generación de radicales libres [Velázquez *et al.*, 2004; Dorado *et al.*, 2003; West *et al.*, 2004].

- Aterosclerosis.

Es la lesión oxidativa de los lípidos de las paredes de los vasos sanguíneos, mediante peroxidación lipídica, altera los fosfolípidos y la estructura celular con la consecuente rotura de la bicapa constitutiva de todas las membranas celulares, lo que lleva a la destrucción de las mismas y de esta manera hay engrosamiento y rigidez de los vasos sanguíneos [Violi *et al.*, 2004; Kawashima, 2004; Masnatta *et al.*, 2003].

- Cáncer.

Estudios indican un aumento del riesgo a ciertos cánceres cuando hay deficiencia de selenio, un elemento antioxidante y cofactor de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa.

Se ha demostrado que la SOD puede inhibir la acción de los promotores tumorales [Behrend *et al.*, 2003; Anesini *et al.*, 2004].

1.7 Sistemas de defensa antioxidante.

En el organismo continuamente se están generando RL por lo que las células han desarrollado mecanismos de defensa que las protegen de los efectos nocivos de éstos, ya sea impidiendo su formación o tratando de contrarrestarlos una vez que se han formado y de esta manera evitan efectos tóxicos sobre la célula; lo antes descrito constituye el mecanismo de defensa de los antioxidantes.

Un antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones, comparado con el sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de este sustrato [Halliwell y Gutteridge, 1999].

Cuando un antioxidante interactúa con un RL, el antioxidante cede un electrón oxidándose a su vez y se transforma en un RL débil no tóxico.

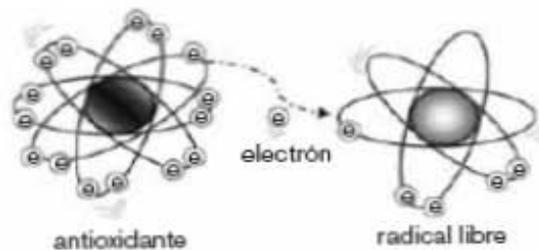


Figura 4. Interacción de radicales libres con antioxidantes.

Los antioxidantes se dividen en enzimáticos y no enzimáticos.

1.7.1 Antioxidantes enzimáticos.

La célula contiene un grupo de enzimas encargadas de la protección contra daño oxidativo, algunas de estas enzimas son:

- Superóxido dismutasa (SOD)

Es una metaloenzima que se presenta en tres formas de diferente localización: la Mn-SOD mitocondrial, CuZn-SOD citosólica y CuZn-SOD extracelular.

Esta enzima se encarga de dismutar al $O_2^{\bullet -}$ de acuerdo a la siguiente reacción:



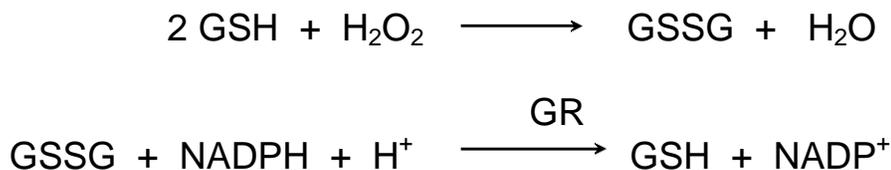
- Catalasa (CAT).

Es una hemoproteína que se encuentra en la mitocondria y en los peroxisomas, en forma secuencial utiliza el H_2O_2 generado por la SOD para formar H_2O y O_2 , según la siguiente reacción:



- Glutatión peroxidasa (GPx).

Es una selenoenzima que se encuentra en el citoplasma y en mitocondrias, cataliza la reducción del H_2O_2 a H_2O , empleando moléculas de glutatión reducido (GSH) como agente reductor. El glutatión oxidado (GSSG) es reducido de nueva cuenta por medio de la glutatión reductasa (GR) en presencia de NADPH y de esta manera se restablece la cantidad de GSH impidiendo que se agote su reserva; a continuación se muestran las reacciones mencionadas precisamente [Rocha, 2005]:



1.7.2 Antioxidantes no enzimáticos.

Dentro de este grupo están aquellos antioxidantes endógenos y exógenos:

- Ácido úrico.

Es el producto final del metabolismo de las purinas y funciona como un buen atrapador de RL. Cuando el ácido úrico reacciona con ERO, se generan alantoína, ácido cianúrico y parabénico y otros productos [Cárdenas y Pedraza, 2006].

- Melatonina.

Es una neurohormona secretada por la glándula pineal, conocida por su capacidad para modular la función endocrina y circadiana [Reiter, 1980] y actualmente también se le ha descrito efectos benéficos actuando como barrador de radicales libres [Reiter, 1995].

Penetra distintas barreras intracelulares, se acumula en los núcleos, donde protege al ADN de distintos factores de estrés.

In vitro la melatonina actúa como un depurador especialmente eficaz del OH^\bullet , además de eliminarlo. Es capaz de proteger las células de la toxicidad molecular desencadenada por el O_2 en los daños celulares asociados a la isquemia-reperfusión.

Se ha demostrado también que estimula a la glutatión peroxidasa (GPx) [Larios, 2004].

- Glutatión reducido (GSH).

Protege a los grupos sulfhidrilo de las proteínas de la acción antioxidante de los RL y tiene la capacidad de reaccionar con el H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el OH^\bullet , posee en su estructura grupos tioles, por lo que tienen un alto poder reductor, por consiguiente, es un buen antioxidante (puede cederle un electrón a los RL, disminuyendo de esta forma su reactividad). Actúa en conjunción con la GPx [Cárdenas y Pedraza, 2006; Klatt y Lamas, 2000; Halliwell y Gutteridge, 1999].

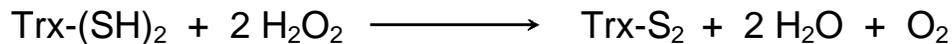
- Bilirrubina.

Es un compuesto liposoluble, es el producto de degradación del grupo hemo, su precursor es la biliverdina. Es un poderoso atrapador de radicales peroxilo y de $^1\text{O}_2$. Cuando se une a la albúmina la protege contra el daño de los RL [Halliwell y Gutteridge, 1999].

- Tiorredoxina (Trx).

Es un polipéptido, distribuido en el retículo endoplásmico [Nakamura, 2005]. Esta proteína contiene dos grupos tiol adyacentes en su forma reducida que se pueden oxidar a su forma disulfuro (S_2 o S-S).

La Trx puede suplir los electrones en diversas reacciones de óxido-reducción, de la misma manera puede reaccionar con H₂O₂ según la siguiente reacción:



- Vitamina C (ácido ascórbico).

Es un compuesto hidrosoluble que se localiza en el citosol y en los fluidos extracelulares, tiene la capacidad de aceptar electrones y reaccionar directamente con el O₂^{•-} y el OH[•], es un regenerador de vitamina E [Iino *et al.*, 2005].

- Vitamina E (α-tocoferol).

Compuesto liposoluble, la isoforma más abundante es el α-tocoferol. Es el antioxidante más distribuido en los seres vivos. Se encuentra en las membranas biológicas y tiene la capacidad de interrumpir la lipoperoxidación en la fase de propagación. Captura O₂^{•-} y OH[•] [Schafer *et al.*, 2002].

- Flavonoides.

Comprende un amplio grupo de compuestos polifenólicos cuya base estructural son anillos aromáticos, su actividad antioxidante radica en su acción como atrapadores de RL y en su habilidad para quelar metales, y así inhibir la peroxidación lipídica.

- Carotenoides.

El β-caroteno y otros compuestos carotenoides relacionados con la vitamina A se encuentran principalmente en membrana y poseen dobles enlaces conjugados. Son antioxidantes liposolubles que también participan en el atrapamiento de RL (atrapador de singulete), reduciendo la peroxidación lipídica [Mathews *et al.*, 2002; Wertz *et al.*, 2005].

- Dimetil sulfóxido (DMSO).

Es una molécula cuya estructura química la forma un grupo sulfóxido, es un disolvente aprótico polar, tiene una constante dieléctrica (capacidad de un solvente para funcionar como aislante de cargas eléctricas) de 48, es un líquido orgánico sin color, soluble en agua y solventes orgánicos, puede disolver muchas sales por su gran polaridad [McMurry, 2001].

Se obtiene de la pulpa de madera de los árboles, como producto secundario obtenido durante la fabricación del papel, ha sido utilizado por muchos años como vehículo en concentraciones de 0.1-0.5%, y en el tratamiento de lesiones dermatológicas, urinarias, reumáticas y manifestaciones renales [Xing y Remick, 2005].

Es un antiinflamatorio de acción local, que actúa atrapando radicales libres y bloqueando la síntesis de prostaglandinas, disminuye la agregación plaquetaria, en estudios recientes se ha demostrado que posee propiedades antioxidantes [Pérez *et al.*, 2006], además es un efectivo secuestrador e inactivador de OH^\bullet , generando formaldehído y metano como productos de la reacción [García, 2001].

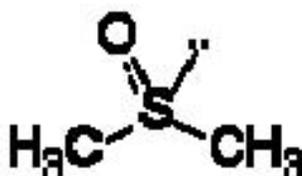


Figura 5. Estructura química del dimetilsulfóxido (DMSO).

1.8 *Garcinia mangostana* y XanGo™.

La fruta mangostán cuyo nombre científico es *Garcinia mangostana*, proviene de un árbol tropical que llega a medir entre 6 y 25 m de alto, y se encuentra distribuido principalmente en la India, Sri Lanka y Tailandia [Jung *et al.*, 2006], pertenece a la familia Guttiferae [Chopra *et al.*, 1956], y tiene el título de “la reina de las frutas” por poseer un exquisito sabor.

La fruta de esta especie es del tamaño de una mandarina, pesa entre 80 y 140 g y sus componentes son (Fig. # 6):

- Pericarpio (corteza o piel), es suave de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{8}$ de pulgada de grueso y es de coloración púrpura.
- Pulpa, consiste de 4 a 8 segmentos oblongos de color blanco, los cuales poseen un sabor exquisito.
- Semillas, por lo general cada fruta contiene dos o tres semillas de $\frac{1}{2}$ a 1 pulgada de largo [Templeman, 2003].



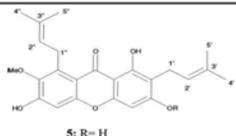
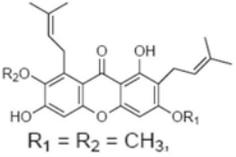
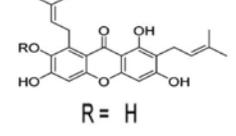
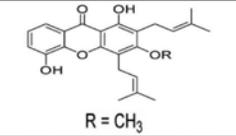
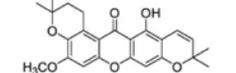
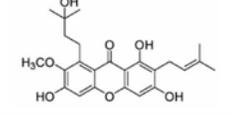
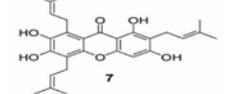
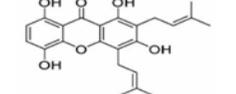
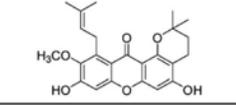
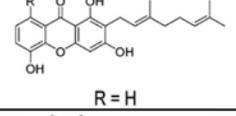
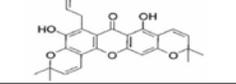
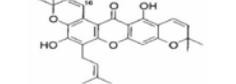
Figura 6. *Garcinia mangostana*

Desde el punto de vista medicinal, el pericarpio del mangostán ha sido usado por muchos años para el tratamiento de infecciones de la piel, heridas y diarrea por muchos años [Jung *et al.*, 2006]; fue en el año de 1693 que un médico de nombre Laurentiers Garcin (cuyo nombre es la base del nombre científico "*Garcinia*") estudió las propiedades del mangostán descubriendo que la fruta ayuda en el tratamiento de diversas inflamaciones intestinales, y a partir de estos resultados surge la necesidad de estudiar científicamente la composición química del mangostán.

Años después, un científico alemán descubrió y aisló del pericarpio del mangostán una molécula orgánica [Schmid, 1855] lo que condujo a determinar su estructura y se encontró que se trataba de moléculas muy rígidas, con un anillo conjugado de seis carbonos, con múltiples enlaces y con gran actividad biológica; este compuesto se identificó como una xantona [Yates y Stout, 1958].

Diversos estudios han revelado que el mangostán posee una gran variedad de xantonas, provenientes principalmente del pericarpio además se ha demostrado que algunas de ellas tiene una función biológica específica [Jung *et al.*, 2006], a continuación en la Tabla 2 se muestran algunas que ya han sido estudiadas:

Tabla 2. Ejemplo de algunas xantonas aisladas de la fruta del mangostán.

Xantona*	Estructura	Actividad biológica	Referencia
α -mangostin	 5: R = H	Antioxidante Antibacteriana	Yates y Stout, 1958. Williams <i>et al.</i> , 1995. Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2000. Suksamrarn <i>et al.</i> , 2003 Jung <i>et al.</i> , 2006.
β -mangostin	 R ₁ = R ₂ = CH ₃	Antifúngica	Gopalakrishnan <i>et al.</i> , 1997.
γ -mangostin	 R = H	Antibacteriana Antifúngica Antioxidante Antiinflamatoria	Jefferson <i>et al.</i> , 1970. Suksamrarn <i>et al.</i> , 2003. Gopalakrishnan <i>et al.</i> , 1997. Jung <i>et al.</i> , 2006. Nakatani <i>et al.</i> , 2004.
Cudraxantona G	 R = CH ₃	Antioxidante	Jung <i>et al.</i> , 2006.
Garcimangosona B		Antioxidante	Sen <i>et al.</i> , 1980. Jung <i>et al.</i> , 2006.
Garcinona D		Antibacteriana Antifúngica Antioxidante	Sen <i>et al.</i> , 1986. Suksamrarn <i>et al.</i> , 2003. Gopalakrishnan <i>et al.</i> , 1997. Jung <i>et al.</i> , 2006.
Garcinona E	 7	Antioxidante	Dutta <i>et al.</i> , 1987. Jung <i>et al.</i> , 2006.
Gartanina		Antifúngica Antioxidante	Govindachari <i>et al.</i> , 1971. Gopalakrishnan <i>et al.</i> , 1997. Jung <i>et al.</i> , 2006.
1-isomangostin		Antioxidante	Mahabusarakam <i>et al.</i> , 1987. Jung <i>et al.</i> , 2006.
Mangostinona	 R = H	Antibacteriana	Asai <i>et al.</i> , 1995. Suksamrarn <i>et al.</i> , 2003
Mangostenona A		Antibacteriana	Suksamrarn <i>et al.</i> , 2002. Suksamrarn <i>et al.</i> , 2003
Tovofilina B		Antibacteriana	Huang <i>et al.</i> , 2001. Suksamrarn <i>et al.</i> , 2003

* Aisladas del pericarpio.

Algunas de estas xantonas poseen actividad fungicida [Gopalakrishnan *et al.*, 1997], antibacteriana [Traidej *et al.*, 2005; Voravuthikunchai y Kitpipit, 2005; Suksamrarn *et al.*, 2003], antioxidante [Jung *et al.*, 2006; Leong y Shui, 2002], antitumoral [Matsumoto *et al.*, 2003, 2004; Ho *et al.*, 2002], antimalárica [Riscoe *et al.*, 2005], antiinflamatoria [Nakatani *et al.*, 2004; Gopalakrishnan *et al.*, 1980] y antialérgica [Nakatani *et al.*, 2002].

Recientemente, se han elaborado productos derivados de *Garcinia mangostana* y son utilizados como suplementos alimenticios, ya que se ha descubierto que la fruta posee la propiedad de ser un potente antioxidante [Jung *et al.*, 2006].

XanGo™ es un jugo que está elaborado con el puré de la fruta entera del mangostán, es decir, las semillas, el pericarpio y la pulpa de la fruta son parte de la preparación del jugo, además de otros ingredientes; en la Tabla 3 se muestra la composición del jugo comercial (Figura 7) y cuyo número de patente es: US 6,730,333 B1 [Garrity *et al.*, 2004].

Tabla 3. Ingredientes del jugo comercial del mangostán (XanGo™).



Figura 7. Jugo comercial XanGo™.

COMPOSICIÓN DEL JUGO DEL MANGOSTÁN.
Jugo de <i>Garcinia mangostana</i> .
Jugo de manzana.
Jugo de pera.
Jugo de uva.
Jugo de bayas.
Jugo de frutilla.
Jugo de arándanos.
Jugo de frambuesa.
Jugo de cereza.
Ácido cítrico.
Sabor natural.
Pectina.
Puré de pera.
Goma de xantano.
Benzoato de sodio.

2 JUSTIFICACIÓN.

Diariamente estamos expuestos a infinidad de compuestos que son perjudiciales para nuestra salud, como es el caso de contaminantes ambientales (ozono, humo de cigarrillo), el oxígeno mismo, radiaciones e incluso, nuestro propio organismo es generador de compuestos altamente reactivos ya sea en los procesos normales del metabolismo o ciertos procesos del mecanismo de defensa contra agentes extraños. Esto conlleva a la pérdida de la homeostasis del cuerpo por la generación de radicales libres.

En los últimos años ha crecido el interés por proteger al organismo contra las ERO ya que estudios recientes han demostrado que se encuentran relacionados en la generación de muchas patologías que afectan diversos sistemas como el circulatorio, el nervioso, el esquelético y el respiratorio, entre otros, que si no se controlan o se detectan a tiempo, pueden provocar la muerte.

En este trabajo se midió la capacidad atrapadora del radical hidroxilo, considerado dentro de las ERO la especie mas reactiva, recientemente se ha reportado que está relacionado con ciertas enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, algunos tipos de cáncer, daño por isquemia y reperfusión, entre otros; otra de sus características importantes es que tiene una vida media muy corta por lo que es muy difícil de estudiarlo.

La fruta del mangostán ha sido utilizada por muchos años como agente terapéutico para ciertos padecimientos, y es por eso que ha crecido el interés por conocer su composición, encontrándose de esta manera que posee sustancias activas denominadas xantonas, las cuales se encuentran principalmente en el pericarpio de la fruta; también se ha descubierto que una de sus características importantes es la de poseer la propiedad antioxidante.

En el presente estudio se analizó el extracto acuoso de la cáscara de la fruta del mangostán, con el fin de determinar si puede proteger a la ASB ante la presencia del OH^\bullet , y de esta manera establecer que cumple su función como agente antioxidante.

Dentro del mercado existe una amplia variedad de productos que fungen como antioxidantes; un ejemplo lo constituye el XanGo™ que está elaborado con la fruta entera del mangostán, es decir, en su composición está presente el pericarpio, las semillas y la pulpa, por lo que también se determinó su capacidad de atrapar el OH^\bullet .

3 HIPÓTESIS.

Existen evidencias de que el OH^\bullet es la más reactiva de las ERO ya que ocasiona alteración en lípidos, proteínas y al ADN; de tal manera que ha crecido el interés por encontrar compuestos que nos protejan de la presencia de este radical.

La fruta del mangostán se ha utilizado en la medicina tradicional como agente curativo para diversos padecimientos; una de sus tantas características es la de poseer propiedades antioxidantes, por lo tanto, se espera que el extracto sea capaz de neutralizar al radical hidroxilo.

4 OBJETIVOS.

General.

Determinar si el extracto del pericarpio de *Garcinia mangostana* y el jugo comercial XanGo™ tienen la capacidad de atrapar el OH^\bullet .

Particulares.

Determinar el valor de CI_{50} para el OH^\bullet del extracto acuoso de la cáscara de mangostán y del jugo comercial XanGo™ y compararlos con el antioxidante DMSO, del cuál ya ha sido reportada su actividad atrapadora de la especie OH^\bullet .

5 MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Reactivos.

Se utilizaron reactivos de las siguientes casas comerciales (entre corchetes se indica el número de catálogo):

- Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA): Albúmina sérica bovina (ASB) [A4503], ácido ascórbico [A7506], dimetil sulfóxido (DMSO) [D5879], acrilamida [A3553], bis-acilamida [M7279], trizma base [T6066], TEMED [T9281], persulfato de amonio [A3678], glicina [G8898], azul de Coomassie R-250 [B0149], lauril sulfato de sodio (SDS) [L4509], mercaptoetanol [M7154], azul de bromofenol [B5525] y glicerol [G5516].

- J. T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México): Ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA) [8993], ácido tricloroacético (TCA) [0414], fosfato de potasio monobásico [3246] y fosfato de sodio dibásico [3828].

- Mallinckrodt (México, DF, México): H₂O₂ [5240].

Todos los compuestos utilizados fueron de calidad grado reactivo.

El jugo de mangostán (XanGo™) se adquirió de Xango LLC, (Lehi, UT, EUA) y el polvo de mangostán de DNP International Inc. (Whittier, CA, EUA).

5.2 Preparación de las muestras.

Las muestras de jugo comercial de XanGo™ se prepararon de la siguiente manera: el contenido de la botella se agitó, se separó una alícuota de 1.5 ml en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C por 10 min.

Las muestras de extracto acuoso del polvo del mangostán se obtuvieron de la siguiente manera: se prepararon 10 ml de una solución al 10% en agua destilada. Esta solución se agitó en vórtex por 10 min, se separó una alícuota de 1.5 ml en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C.

En ambos casos se usó una centrífuga de la marca Beckman modelo J2-21 y el rotor rotor JA-18.1 (r=10.5 cm), se obtuvo el sobrenadante y se hicieron diluciones con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4.

El antioxidante de referencia evaluado fue DMSO.

5.3 Evaluación de la capacidad atrapadora sobre el OH•.

La ASB se expuso a la acción del OH• (generado mediante la reacción de Fenton) y la magnitud del daño a esta proteína (degradación) se visualizó en geles de poliacrilamida mediante la tinción con azul de Coomassie y se cuantificó mediante un análisis densitométrico.

La adición de un compuesto atrapador de OH• como el DMSO al sistema impidió la degradación de la ASB, lo que demostró que el daño fue provocado por este radical.

5.4 Ensayo.

En la siguiente tabla se indican los componentes (y sus volúmenes) para generar el daño a la ASB por el OH•:

	ASB 1% (ml)	Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 (ml)	Solución A 1X (ml)	Solución A 2X (ml)	Muestra (ml)	H ₂ O ₂ 2% (ml)
Control 1	0.25	0.25	---	---	---	---
Control 2	0.25	---	0.25	---	---	0.01
Muestra	0.25	---	---	0.125	0.125	0.01

Solución A IX: Ácido ascórbico (1.6 mM)/EDTA (0.8 mM)/(NH₄)₂Fe(SO₄)₂ (0.8 mM).

El control 1 es la referencia donde la ASB no ha sufrido daño por el OH•, ya que no está presente.

Por otro lado, el control 2 es la referencia donde se expone el máximo daño provocado por el OH• a la ASB.

Todos los componentes se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se mezclaron y la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se adicionaron 0.25 ml de TCA al 10%, se agitó en vórtex y se centrifugó a 5,000 rpm por 30 min a 4 °C.

El sobrenadante se desechó y el precipitado se disolvió en 0.5 ml de NaOH 0.1 M.

5.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

En un tubo Eppendorf se mezclaron 0.008 ml del resuspendido (que corresponden a 40 µg de ASB) y se mezclaron con 0.008 ml del amortiguador de carga 1X. Esta mezcla se colocó en agua hirviendo por 1.5 min para posteriormente colocarse en un pozo del gel de poliacrilamida para realizar la electroforesis en una cámara Mygthy Small II SE 250 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ, EUA) a 20 mA (por cada gel) por aproximadamente 2.5 h.

Para visualizar las bandas de ASB, los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie al 0.2%; metanol al 45%, ácido acético al 10%) durante 3 h a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de colorante los geles se colocaron en una solución de metanol al 45% y ácido acético al 10%.

La imagen de cada gel se digitalizó con ayuda de un escáner Hewlett Packard modelo 2200 y el área de cada banda de ASB se cuantificó con el programa Sigma ScanPro versión 4.

Con los valores de áreas obtenidos mediante el análisis densitométrico, el porcentaje de daño a la ASB se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\left[\frac{(\text{Área}_{\text{ASB+muestra+OH}\bullet} - \text{Área}_{\text{ASB+OH}\bullet})}{\text{Área}_{\text{ASB}} - \text{Área}_{\text{ASB+OH}\bullet}} \right] \times 100$$

Considerando que el 100% de daño corresponde a 0% de capacidad atrapadora, a 100 se le restó el valor obtenido con la fórmula anterior para determinar el porcentaje de capacidad atrapadora.

Con los valores de porcentaje de capacidad atrapadora y la concentración de las muestras se hicieron gráficas para calcular el valor de CI_{50} (la concentración de la muestra a la cual se logra el 50% de atrapamiento del OH^\bullet) mediante un análisis de regresión lineal realizado en el programa Excel 97 para Windows.

5.6 Análisis estadístico.

Las comparaciones de la capacidad atrapadora se realizaron con el programa de estadística Prism 3.02 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Se utilizó la prueba paramétrica t-Student no pareada, donde se compararon los valores de CI_{50} de cada compuesto, con el fin de discernir si son iguales las muestras entre sí. Los datos están expresados como media \pm error estándar de la media.

Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 Implementación de la técnica de electroforesis.

La técnica de electroforesis SDS-PAGE ya se encontraba establecida de forma general en el laboratorio, que dependiendo de la proteína de interés las cantidades manejadas para esta técnica oscilan de entre 10-100 μg . El primer paso para este trabajo fue hallar las condiciones en las que se pudiera ver el efecto concentración-respuesta, por lo que se inició con 37.5 μg de ASB, de esta manera se obtuvo el primer gel (Figura 8A), como se observa la cantidad de proteína es muy baja, así que se optó por aumentar al doble la cantidad de ASB, es decir, a 75 μg (Figura 8B), caso contrario ahora la cantidad de proteína fue excesiva. Después de varios ensayos se encontró la concentración adecuada donde se pudiera ver el efecto esperado que fue de 40 μg (Figura 8C). Por otro lado se realizaron diferentes pruebas para demostrar que la proteína no se degradaba por las condiciones del ensayo, para evitar interferencia con los resultados (geles no mostrados).

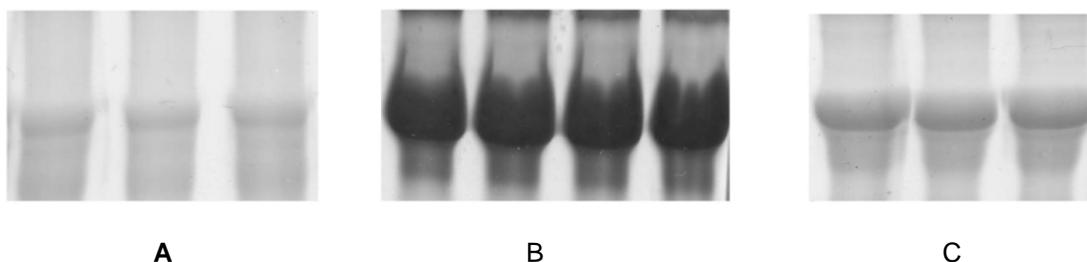
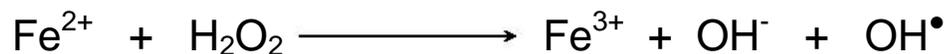


Figura 8. Perfil electroforético de la ASB a diferentes concentraciones: (A) 37.5 μg , (B) 75 μg y (C) 40 μg .

Una vez que se implantaron las condiciones de proteína se manejaron las muestras objeto de estudio, en donde se evaluaron a diferentes concentraciones hasta encontrar aquellas en donde se pudiera ver el efecto concentración-respuesta, y solo se consideraron los datos representativos que mostraron este comportamiento para calcular el valor de CI_{50} , descartándose aquellos datos en los que a concentraciones bajas no se observó ningún efecto o la respuesta permaneció constante.

6.2 Generación del sistema de reacción.

El sistema de reacción para inducir la generación de OH^\bullet fue por medio de la reacción tipo Fenton, que se lleva a cabo entre un metal de transición (Fe^{2+}) y H_2O_2 :



El EDTA es importante para este sistema, ya que forma un complejo con Fe^{2+} el cuál cataliza la reacción, con otros metales como por ejemplo el Cu^{2+} no es necesario su adición [Kocha *et al.*, 1997].

Una vez formada, la especie reactiva oxidó a la ASB provocando su degradación completa como se ve en la figura 9 (segundo carril) en cambio cuando el OH^\bullet no se genera la proteína no sufre daño (primer carril).



Figura 9. Gel SDS-PAGE que muestra a la ASB en (A) ausencia y (P) presencia de OH^\bullet , en el primer carril la proteína no ha sufrido degradación, pero en el segundo el daño es completo.

6.3 Evaluación antioxidante del extracto acuoso del mangostán.

Con el fin de determinar las condiciones del extracto acuoso en el cuál muestre capacidad antioxidante se evaluaron diferentes concentraciones: 10%, 20%, 40% y 60%, en la figura 10 se muestra que a mayor concentración del extracto se observa menor protección antioxidante, esto puede ser debido a que a altas concentraciones puede ser tóxico [Suksamrarn *et al.*, 2006].

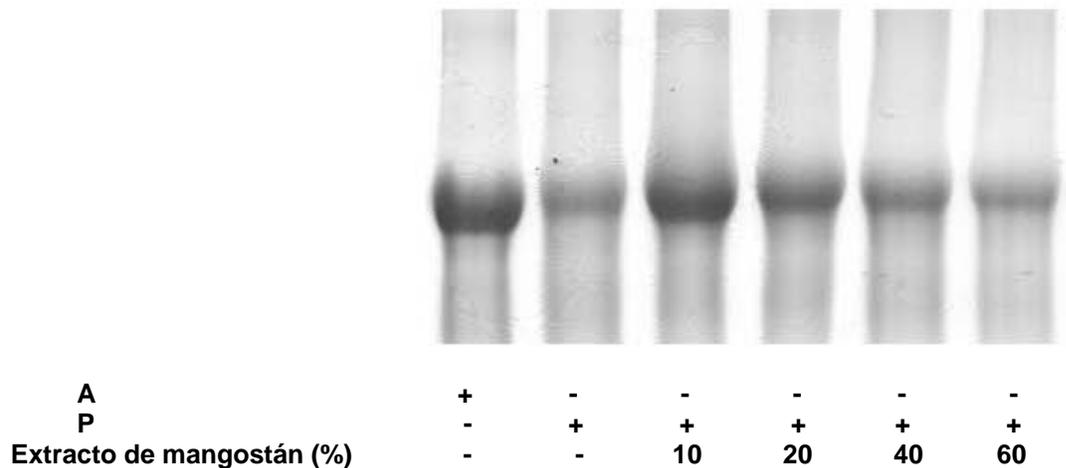


Figura 10. Perfil electroforético de la ASB tratada con OH^\bullet en presencia de 10, 20, 40 y 60% de extracto de mangostán. Los geles muestran las bandas de la proteína en (A) ausencia, (P) presencia de OH^\bullet y diferentes concentraciones de extracto acuoso de mangostán.

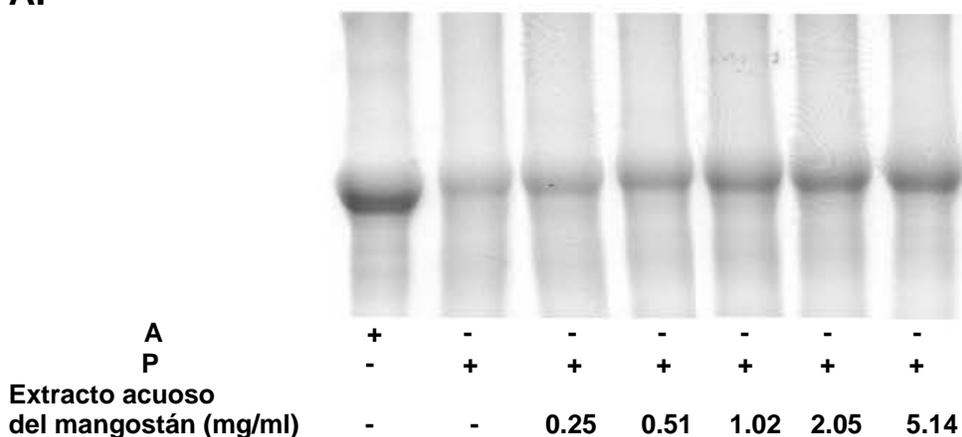
Con base en lo anterior se utilizó la concentración mínima (10%) para ver el efecto antioxidante contra el radical hidroxilo, ya que presenta una mejor respuesta que en las demás donde se pierde el efecto, de este dato partimos para hacer diluciones hasta encontrar aquellas en que el extracto ya no protegiera a la proteína del OH^\bullet .

Para determinar la capacidad antioxidante de un compuesto es necesario obtener la Cl_{50} , que se define como la concentración del compuesto, en el cuál puede atrapar el 50% de una especie reactiva en particular, por ello para determinar dicho valor y compararlo con el compuesto de referencia se determino la concentración de sólidos en un mililitro de muestra concentrada.

Establecidas las condiciones del ensayo para el extracto de mangostán se corrieron geles SDS-PAGE (n=5), de esta forma en la figura 11A se observa perfectamente el comportamiento concentración-respuesta, donde el efecto es directamente proporcional a la concentración del extracto, y por otro lado, se puede apreciar en el perfil electroforético que existe un daño total a la proteína cuando el OH^\bullet esta presente en el medio (segundo carril).

Extrapolando los datos en forma gráfica mediante el análisis densitométrico en la Figura 11B se ve que el extracto alcanzó aproximadamente 90% de atrapamiento del OH^\bullet a la concentración de 5.14 mg/ml, en cambio a partir de la concentración 0.51 mg/ml el efecto ya no cambió siendo constante para concentraciones mas bajas. Estos datos son los que se consideraron para calcular el valor de Cl_{50} .

A.



B.

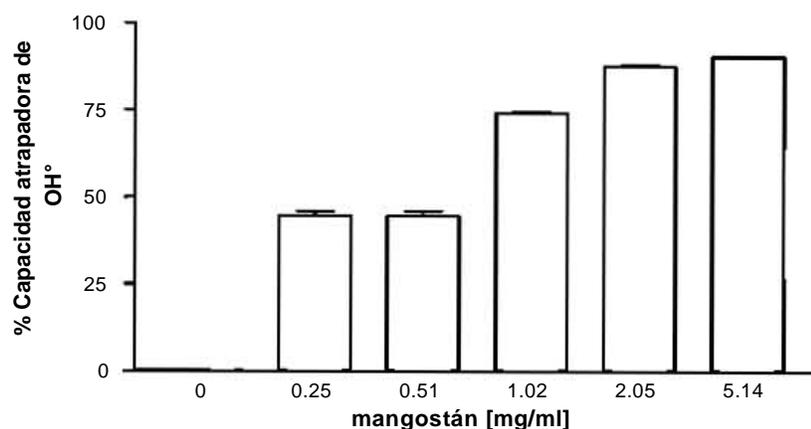
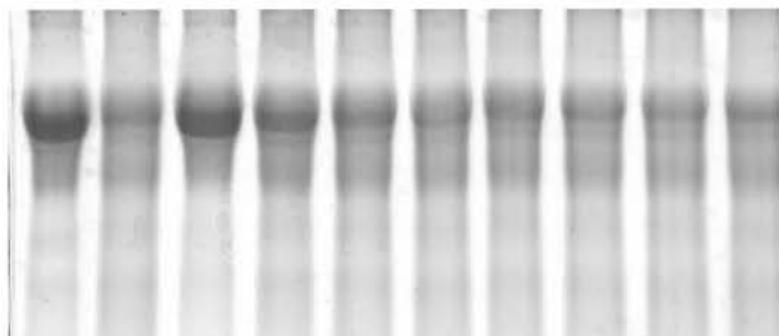


Figura 11.

- A.** Gel SDS-PAGE del extracto acuoso del mangostán teñido con azul de Coomassie, donde se muestra la banda representativa de la ASB en (A) ausencia y (P) presencia de OH^\bullet y en presencia de OH^\bullet con diferentes concentraciones de extracto.
- B.** Efecto de la capacidad atrapadora de OH^\bullet del mangostán. Los datos están expresados como media \pm EE. $n=5$.

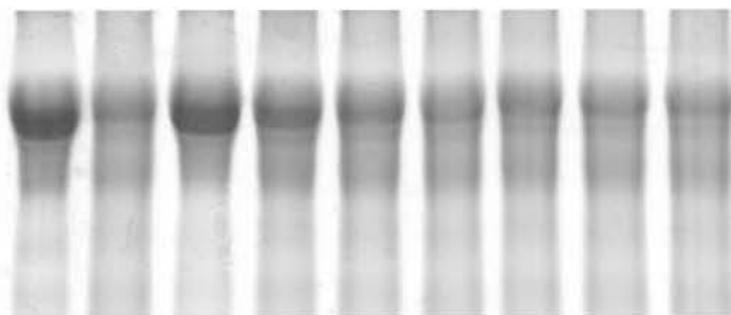
6.4 Evaluación antioxidante de XanGo™

Para determinar la concentración óptima del producto comercial se realizaron diferentes diluciones, comenzando con una alícuota tomada directamente del frasco, ya que como se trata de un producto terminado este fue el punto de partida. En primera se utilizaron diluciones muy amplias que fueron desde 1:5 a 1:400 (Figura 12), en donde se vio que a mayor dilución ya no se aprecia respuesta ni protección a la ASB, en base a diversos ensayos y disminuyendo el rango de dilución se encontraron aquellas concentraciones en donde se observó mejor respuesta (Figura 13).



A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XanGo™ (ml)	-	-	S/D	1:5	1:50	1:100	1:150	1:200	1:300	1:400

Figura 12. Perfil electroforético de la ASB tratada con OH• utilizando diferentes diluciones de XanGo™. Los geles muestran las bandas de la proteína en (A) ausencia, (P) presencia de OH• y diferentes concentraciones de jugo de mangostán.



A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P	-	+	+	+	+	+	+	+	+
XanGo™ (ml)	-	-	S/D	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:100

Figura 13. Perfil electroforético de la ASB tratada con OH• utilizando diferentes diluciones de XanGo™. Los geles muestran las bandas de la proteína en (A) ausencia, (P) presencia de OH• y diferentes concentraciones de jugo de mangostán.

Para conocer las concentraciones en gramos de XanGo™, y de esta forma comparar resultados con los demás compuestos se obtuvo el peso de los sólidos en un mililitro de muestra concentrada, estos resultados son los que se manejaron para cálculos posteriores.

Una vez que se establecieron las condiciones del ensayo para esta muestra se corrieron geles SDS-PAGE (n=5), observando en la figura 14A que el jugo presenta el mismo efecto concentración-respuesta, pero no protegió totalmente a la ASB del OH[•].

En la figura 14B se puede ver que XanGoTM atrapa aproximadamente un 94% al OH[•] a una concentración de 25.73 mg/ml de acuerdo al análisis densitométrico y siendo la concentración mas baja de atrapamiento de 0.25 mg/ml dónde atrapó aproximadamente 20%.

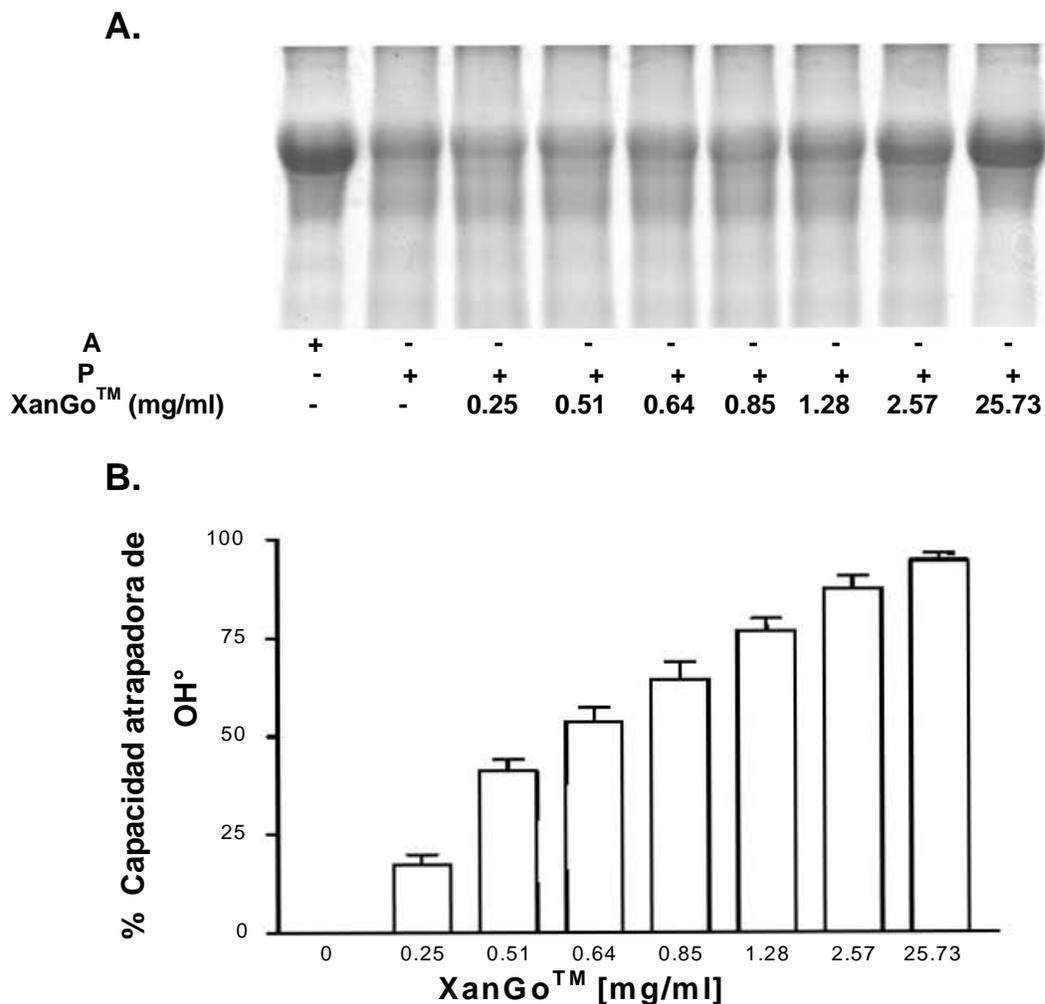


Figura 14.

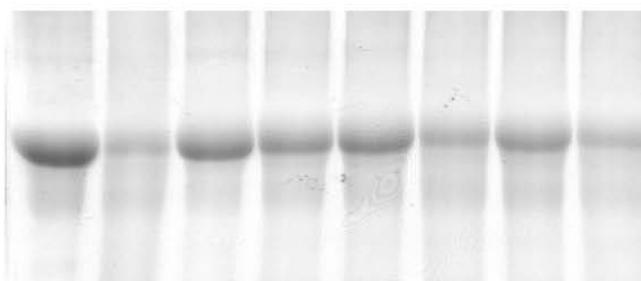
- A.** Gel SDS-PAGE de XanGoTM teñido con azul de Coomassie, donde se muestra la banda representativa de la ASB en (A) ausencia, (P) presencia del OH[•] y en presencia del OH[•] con diferentes concentraciones de XanGoTM.
- B.** Efecto de la capacidad atrapadora del jugo de mangostán (XanGoTM) sobre la generación de OH[•]. Los datos están expresados como media±EE. n= 5.

Es importante señalar que de acuerdo a la Tabla 3 donde se detallan los ingredientes de XanGo™, el benzoato de sodio es un componente de este jugo, que además de ser utilizado como conservador de alimentos ha mostrado también tener capacidad antioxidante [Yamaguchi *et al.*, 2006], es por eso que se determinó la concentración presente por fotometría de flama y se estableció que tiene una concentración de 0.13392 g de benzoato de sodio por cada 100 ml de XanGo™.

Para descartar que el efecto antioxidante que mostró XanGo™ pudiera deberse a la presencia del benzoato de sodio, se corrieron geles SDS-PAGE (n=3) de forma comparativa manejando el jugo y benzoato (a la concentración presente en el jugo) a las mismas condiciones del ensayo y se pudo observar que si hay protección a la ASB, es decir, se presenta el efecto concentración-respuesta, pero es menor en comparación con la de XanGo™ (Figura 15A).

Extrapolando estos datos en forma gráfica (Figura 15B) se aprecia mas esta diferencia a una dilución 1:20 el efecto protector del benzoato de sodio casi desaparece, en cambio con XanGo™ a esta dilución todavía existe cerca de un 70% de protección, por lo que se puede decir que el benzoato de sodio participa de forma mínima como protector de la ASB cuando está presente el OH• en el medio.

A.



A	+	+	+	+	+	+	+	+
P	-	+	+	+	+	+	+	+
XanGo™ (Dilución)*	-	-	S/D	-	1:10	-	1:20	-
Benzoato de sodio (Dilución)**	-	-	-	S/D	-	1:10	-	1:20

B.

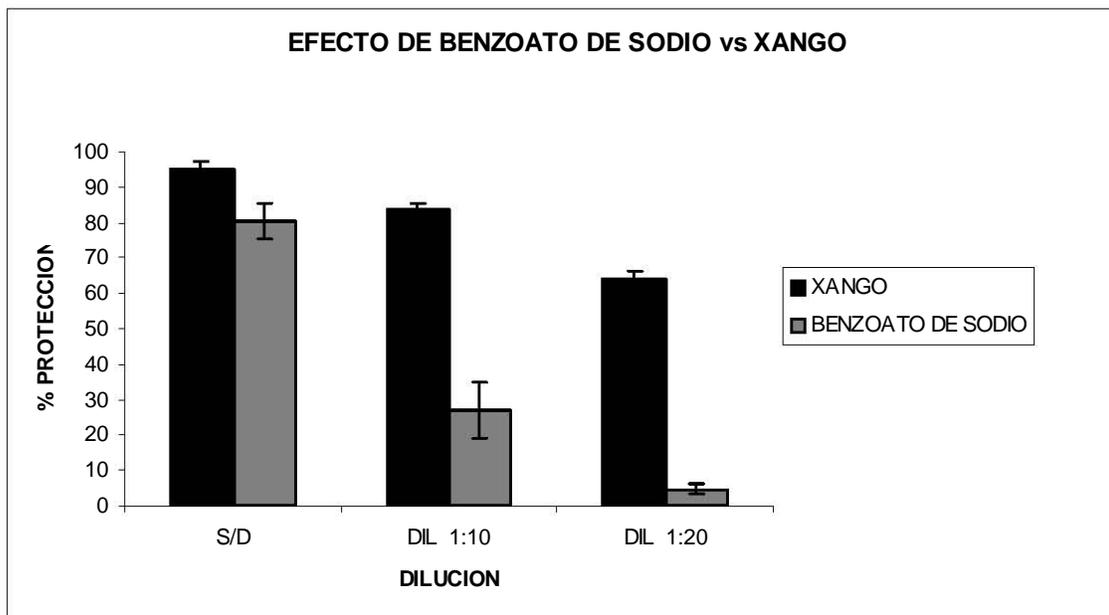


Figura 15.

- A. Gel SDS-PAGE comparando el efecto protector del benzoato de sodio con XanGo™ .
* Las concentraciones de XanGo™ utilizadas son (S/D) 25.73 mg/ml, (1:10) 2.57 mg/ml, (1:20) 1.28 mg/ml
**Las concentraciones de benzoato de sodio son (S/D) 0.3282 mg/ml, (1:10) 0.0328 mg/ml y (1:20) 0.016 mg/ml.
- B. Comparación del efecto protector del benzoato de sodio con la concentración presente en el jugo y XanGo™. Los datos están expresados como media±EE. n=3

6.5 Evaluación antioxidante del compuesto de referencia: DMSO

Para fines comparativos de la capacidad antioxidante se utilizó DMSO, un compuesto que anteriormente se había reportado que tiene capacidad antioxidante, además de conocerse el valor de Cl_{50} de acuerdo a la literatura [Floriano-Sánchez et al. 2006], con este dato se inició para llevar a cabo la técnica que, de igual manera después de diferentes ensayos, se encontraron aquellas concentraciones en las que se observara mejor respuesta.

En la Figura 16A se presenta el gel SDS-PAGE y se puede observar que el DMSO puede atrapar el OH^{\bullet} sin embargo no inhibió por completo el daño, mostrando una respuesta directamente proporcional a la concentración; para este compuesto hubo mayor rango de concentraciones utilizadas.

En la Figura 16B se muestran los datos obtenidos mediante el análisis densitométrico a partir de los cuales se calculó el valor de CI_{50} ; como se puede observar el DMSO alcanza aproximadamente un 98% de atrapamiento a 3.14 mg/ml, por otro lado, a la concentración 0.03 mg/ml la capacidad atrapadora es de aproximadamente 40% y a concentraciones mas bajas se pierde el efecto.

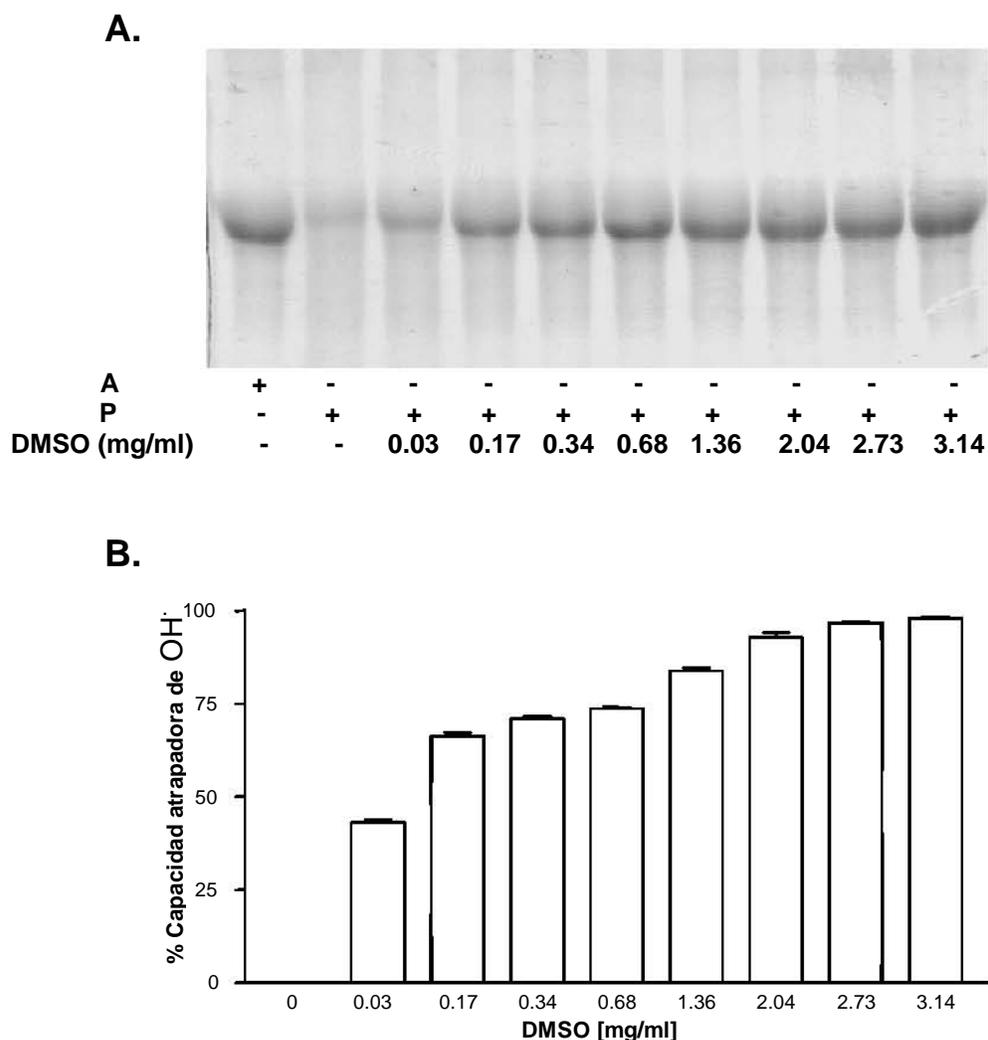


Figura 16.

- C. Gel SDS-PAGE del DMSO teñido con azul de Coomassie, donde se muestra la banda representativa de la ASB en (A) ausencia, (P) presencia del OH^\bullet y en presencia de OH^\bullet con diferentes concentraciones de DMSO.
- D. Efecto de la capacidad atrapadora de OH^\bullet del DMSO. Los datos están expresados como media \pm EE. n= 4.

6.6 Análisis estadístico de la capacidad antioxidante.

En forma general en la figura 17 vemos representados en forma gráfica los valores de CI_{50} de las tres muestras, podemos decir que el mejor atrapador de OH^\bullet es el DMSO, mientras que XanGoTM se requieren aproximadamente 10 veces más para obtener el mismo efecto del DMSO. Por otro lado, los valores de CI_{50} del extracto acuoso del mangostán y de XanGoTM son similares.

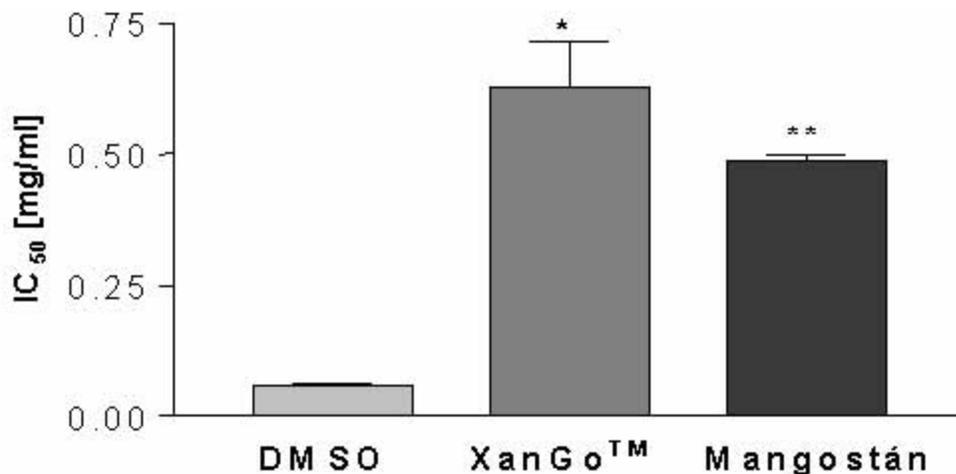


Figura 17. Valores de CI_{50} de DMSO (n=4), XanGoTM (n=5) y mangostán (n=4). Los grupos marcados son significativamente diferentes *P<0.05 vs DMSO y ** P<0.0001 vs DMSO.

Los datos mostrados en la Tabla 4 son los valores de CI_{50} de las muestras en estudio, y confirman que el DMSO es el mejor antioxidante con capacidad de atrapar OH^\bullet bajo las condiciones manejadas es el presente trabajo.

Tabla 4. Tabla comparativa de los valores de CI_{50} de los compuestos analizados, presentados como media \pm EE.

Compuesto	CI_{50} (mg/ml)
Mangostán	0.486 ± 0.006 n= 4
DMSO	0.058 ± 0.003 n= 4
XanGo TM	0.628 ± 0.085 n= 5
Benzoato de sodio	0.064 ± 0.032 n= 3

7 CONCLUSIONES.

- El extracto acuoso del mangostán, el jugo XanGo™ y el DMSO tienen capacidad para atrapar OH^\bullet .
- El extracto acuoso del mangostán y el jugo XanGo™ presentaron capacidad similar para atrapar OH^\bullet (los valores de Cl_{50} son semejantes).
- En comparación con el compuesto de referencia, el extracto de mangostán y XanGo™ poseen ocho y diez veces respectivamente menos capacidad antioxidante.
- La capacidad antioxidante del jugo comercial XanGo™ puede explicarse en cierta forma debido a que en su composición está presente la fruta del mangostán, aunque no se puede asegurar rotundamente debido a que el jugo posee otros ingredientes.
- Se comprobó mediante esta técnica que el DMSO cumple su función como agente antioxidante como ya se había reportado en la literatura.

8 APÉNDICE.

- Amortiguador de carga IX.
Tris-HCl, 50 mM, pH 6.8
Ditioneitol 100 mM
SDS 2%
Azul de bromofenol al 0.1%
Glicerol al 10%

- Amortiguador de electroforesis (Tris glicina IX, pH 8.3):
Tris base 25 mM
Glicina 250 mM
SDS 0.1%

- Gel separador al 12%:
 - a) 2.5 ml de H₂O
 - b) 3.04 ml de acrilamida al 30%
 - c) 1.9 ml de Tris 1.5 M pH 8.8
 - d) 0.076 ml de SDS al 10%
 - e) 0.076 ml de Persulfato de amonio al 10%
 - f) 0.003 ml de TEMED

- Gel concentrador al 5%:
 - a) 1.4 ml de H₂O
 - b) 0.33 ml de acrilamida al 30%
 - c) 0.25 ml de Tris 0.5 M pH 6.8
 - d) 0.02 ml de SDS al 10%
 - e) 0.020 ml de persulfato de amonio al 10%
 - f) 0.002 ml de TEMED

- Solución A (ácido ascórbico 3.2 mM/EDTA 1.6 mM/(NH₄)₂Fe(SO₄)₂ 1.6 mM) 2X.
 - a) 0.01124 g de ácido ascórbico
 - b) 0.01193 g de EDTA
 - c) 0.01252 g de sulfato de hierro amoniacal.
 - d) 20 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4

- Solución A (ácido ascórbico 1.6 mM/EDTA 0.8 mM/(NH₄)₂Fe(SO₄)₂ 0.8 mM) 1X:
 - a) 7.5 ml de solución A 2X
 - b) 7.5 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4

- ASB 1%:
 - a) 0.1 g de ASB
 - b) 10 ml de solución A 1X

- Solución de azul de Coomassie:
 - a) 0.4 g de azul de Coomassie
 - b) 20 ml de ácido acético glacial
 - c) 90 ml de metanol
 - d) 90 ml de H₂O

- Solución decolorante:
 - a) 20 ml de ácido acético glacial
 - b) 90 ml de metanol
 - d) 90 ml de H₂O

9 ABREVIATURAS.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASB	Albúmina sérica bovina
CAT	Catalasa
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Error estándar
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GM	<i>Garcinia mangostana</i>
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HOCl	Ácido hipocloroso
MnSOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
NADP ⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato
NADPH	Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato
OH [•]	Radical hidroxilo
RL	Radical libre
SOD	Superóxido dismutasa
XDH	Xantina deshidrogenasa
XO	Xantina oxidasa
TCA	Ácido tricloroacético
Trx	Tiorredoxina

9 REFERENCIAS.

Anesini C, Turner S, Borda E, Ferraro G, Coussio J. **2004**. Effect of *Larrea divaricata* Cav. Extract and nordihydroguaiaretic acid upon peroxidase secretion in rat submandibulary glands. *Pharmacol Res* 49:441-448.

Asai F, Tosa H, Tanaka T, Iinuma M. **1995**. A xanthone from pericarps of *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* 39:943-944.

Behrend L, Handerson G, Zwacka RM. **2003**. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 31:1441-1444.

Bensasson RV, Land EJ, Truscott TG. **1993**. Excited states and free radicals in biology and medicine. Contributions from flash photolysis and pulse radiolysis. Oxford University Press. pp:101-141.

Cao Y, Chu Q, Ye J. **2003**. Determination of hydroxyl by capillary electrophoresis and studies on hydroxyl radical scavenging activities of chinese herbs. *Anal Bioanal Chem* 376:691-695.

Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. **2006**. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17:164-173.

Chaible LM, Alba-Loureiro TC, Maia AA, Pugine SM, Valle CR, Pithon-Curi TC, Curi R, De Melo MP. **2005**. Effect of *Cysticercus cellulosae* on neutrophil function and death. *Vet Parasitol* 20:121-129.

Cheng FC, Jen JF, Tsai TH. **2002**. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 781:481-496.

Chopra RN, Nayar SL, Chopra JC. **1956**. Glossary of Indian Medicinal Plants National Institute of Science Communication and Information Resources. New Delhi, India. pp:122-123.

Davies K, Delsignore M. **1987**. Protein damage and degradation by oxygen radicals. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem* 262:9908-9913.

Dorado MC, Rugerio VC, Rivas AS. **2003**. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM* 46:229-235.

Dutta PK, Sen AK, Sarkar KK, Banerji N. **1987**. Acid-catalysed cyclisations of xanthenes: structure of a new xanthone from *Garcinia mangostana* Linn. *Ind J Chem* 26B:281-282.

Eberhardt MK, **2001**. *Reactive oxygen metabolites. Chemistry and Medical Consequences*, CRC Press.

Florian-Sánchez SE, Villanueva C, Medina CO, Rocha D, Sánchez GD, Cárdenas RN, Pedraza CJ. 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.

Ferrer D, Jorge C, Cutiño I, García RE, Arce L. **1999**. Radicales libres y su papel en la homeostasis neuronal. *MEDISAN* 3:5-11.

García J. **2001**. Efecto del dimetilsulfóxido en la respuesta quimioluminiscente y el consumo de oxígeno de neutrófilos humanos activados. *Rev Costarric Cienc Med*. 22:17-32.

Garrity AR, Morton GA, Morton JC. **2004**. Nutraceutical mangosteen composition. United States Patent No. US 6,730,333 B1.

Glaser CB, Yamin G, Uversky VN, Fink AL. **2005**. Methionine oxidation, alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 17:157-169.

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, Shankaranayanan D, Kameswaran L, Nazimudeen SK. **1980**. Effect of mangostin, a xanthone from *Garcinia mangostana* Linn, in immunopathological and inflammatory reactions. *Ind J Exp Biol* 18:843-846.

Govindachari TR, Kalyanaraman PS, Muthukumaraswamy N, Pai BR. **1971**. Xanthenes of *Garcinia mangostana* Linn. *Tetrahedron* 27:3919-3926.

Halliwell B, Gutteridge JMC. **1999**. Free radicals in biology and medicine. Oxford, 3^a ed. pp:294-295, 327-328, 335-336, 342-343.

Hansberg W. **2002**. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico* 26:19-54.

Ho CH, Huang YL, Chen CC. **2002**. Garcinone E, a xanthone derivate, has potent cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma cell lines. *Planta Med* 68:975-979.

Huang YL, Chen CC, Chen YJ, Huang RL, Shieh BJ. **2001**. Three xanthenes and benzophenone from *Garcinia mangostana*. *J Nat Prod* 64:903-906.

Iino K, Iwase M, Sonoki K, Yoshinari M, Iida M. **2005**. Combination treatment of vitamin C and desferrioxamine suppresses glomerular superoxide and prostaglandin E production in diabetic rats. *Diabetes Obes Metab* 7:106-119.

Jefferson A, Quillinan AJ, Scheinmann F, Sim KY. **1970**. Studies in the xanthone series. Isolation of γ -Mangostin from *Garcinia mangostana* and preparation of the natural mangostin by selective demethylation. *Aust J Chem* 23:2539-2543.

Jezek P, Hlavatá L. **2005**. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2478-2503.

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.

Kawamoto EM, Muñoz CD, Glezer I, Bahia VS, Caramelli P, Nitrini R, Gorjao R, Curi R, Scavone C, Marcourakis T. **2005**. Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 26:857-864.

Kawashima S. **2004**. The two faces of endothelial nitric oxide synthase in the pathophysiology of atherosclerosis. *Endothelium* 11:99-107.

Klatt P, Lamas S. **2000**. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 267:4928-4944.

Kocha T, Yamaguchi M, Ontaki H, Fukuda T, Aoyagi T. **1997**. Hydrogen peroxide-mediated degradation of protein: different oxidative modes of copper- and iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin. *Biochim Biophys Acta* 1337:319-326.

Larios FA. **2004**. Efecto antioxidante de la melatonina exógena y posible disminución de la fibrosis en las lesiones esofágicas por cáusticos. Estudio experimental. Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas. Facultad de Medicina y Centro de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Colima. Colima, México pp:4-13.

Leong LP, Shui G. **2002**. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem* 76:69-75.

Mahabusarakam W, Wiriyachitra P, Taylor WC. **1987**. Chemical constituents of *Garcinia mangostana*. *J Nat Prod* 5:474-478.

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.

Masnatta LD, Fischer PA, Domínguez GN, Cabrera EI, Ramírez AJ, Sánchez RA. **2003**. Marcadores de estrés oxidativo. Su valor en la prevención y detección precoz de la enfermedad cardiovascular en el Hospital de Día. *Rev Fed Arg Cardiol* 32:177-183.

Mathews C, Holde KE, Ahern KG. **2002**. Bioquímica. Pearson Addison Wesley, 3ª ed. pp:618-621.

Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Inuma M, Nozawa Y. **2003**. Induction of apoptosis by xanthones from mangosteen in human leukemia cell lines. *J Nat Prod* 66:1124-1127.

Matsumoto K, Akao Y, Yi H, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Kobayashi E, Inuma M, Nozawa Y. **2004**. Preferential target is mitochondria in α -mangostin-induced apoptosis in human leukemia HL60 cells. *Bioorg Med Chem* 12:5799-5806.

McMurry J. **2001**. Química Orgánica. International Thomson Editores. 5ª ed. pp: 411, 730.

Nakamura H. **2005**. Thioredoxin and its related molecules: up-date 2005. *Antiox Redox Signal* 7:823-825.

Nakatani K, Atsumi M, Arakawa T, Oosawa K, Shimura S, Nakahata N, Ohizumi Y. **2002**. Inhibitions of histamine release and prostaglandin E₂ synthesis by mangosteen, a Thai medicinal plant. *Biol Pharm Bull* 25:1137-1141.

Nakatani K, Yamakuni T, Kondo N, Arakawa T, Oosawa K, Shimura S, Inoue H, Ohizumi Y. **2004**. γ -Mangostin inhibits inhibitor- κ B kinase activity and decreases lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 gene expression in C6 rat glioma cells. *Mol Pharmacol* 66:667-674.

Pérez R, Martínez E, Garduño L, Conde I, Chamorro G. **2006**. Effects of dimethylsulphoxide on mice arsenite-induced dysmorphogenesis in embryo culture and cytotoxicity in embryo cells. *Toxicol Lett* 161:167-173.

Reiter RJ. **1995**. Oxidative process and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 9:526-533.

Reiter RJ. **1980**. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1:109-131.

Ríos MC. **2003**. El estrés oxidativo y el destino celular. *Quím Viva* 2.

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

Rocha D. **2005**. Estudio de la capacidad del ácido nordihidroguayarático y de la s-alilcisteína para atrapar especies reactivas de oxígeno. Tesis de Licenciatura. Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM, México D.F. pp:9-10.

Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo Y. **2001**. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit* 30:36-44.

Roos D, Bruggen R, Meischl C. **2003**. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect* 5:1307-1315.

Schafer FQ, Wang HP, Kelley EE, Cueno KL, Martin SM, Buettner GR. **2002**. Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. *Biol Chem* 383:671-681.

Schmid W. **1885**. Ueber das mangostin. *Liebigs ANN Chem* 93:83-89.

Sen AK, Sarkar KK, Majumder PC, Banerji N. **1986**. Garcinone-D, a new xanthone from *Garcinia mangostana* Linn. *Ind J Chem* 25B:1157-1158.

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

Stadtman ER, Berlett BS. **1991**. Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J Biol Chem* 226:17201-17211.

Suksamrarn S, Suwannapoch N, Ratananukul P, Aroolerk, Suksamrarn A. **2002**. xanthones from the green fruit hulls of *Garcinia mangostana*. *J Nat Prod* 65:761-763.

Suksamrarn S, Narisara S, Phakhodee W, Thanuhiranlert J, Ratananukul P, Chimnoi N, Suksamrarn A. **2003**. Antimycobacterial activity of prenylated xanthones 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 Xanthones from the young fruit of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull* 54:301-305.

Templeman JF. **2003**. Mangostán el Factor X. Sound Concepts. 3ª ed. pp:1-12.

Traidej CM, Surassmo S, Nukoolkan VS, Gritsanapan W. **2005**. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J Ethnopharmacol* 101:330-333.

Velázquez PM, Prieto GB, Contreras PR. **2004**. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias* 75:36-43.

Violi F, Cangemi R, Sabatino G, Pignatelli P. **2004**. Vitamin E for the treatment of cardiovascular disease: is there a future? *Ann NY Acad Sci* 1031:292-304.

Voravuthikunchai SP, Kitpipit L. **2005**. Activity of medicinal plants extracts against hospital isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 11:510-512.

Wertz K, Hunziker PB, Seifert N, Riss G, Neeb M, Steiner G, Hunziker W, Goralczyk R. **2005**. beta-carotene interferes with ultraviolet light A-induced gene expression by multiple pathways. *J Invest Dermatol* 124:428-434.

West M, Mhatre M, Ceballos A, Floyd RA, Grammas P, Gabbita SP, Hamdheydari L, Mai T, Mou S, Pye QN, Stewart C, West S, Williamson KS, Zemlan F, Hensley K. **2004**. The arachidonic acid 5-lipoxygenase inhibitor nordihydroguaiaretic acid inhibits tumor necrosis factor alpha activation of microglia and extends survival of G93A-SOD1 transgenic mice. *J Neurochem* 91:133-143.

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, 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.

Xing L, Remick DG. **2005**. Mechanisms of dimethyl sulfoxide augmentation of IL-1 β production. *J Immunol* 174:6195-6202.

Yates P, Stout GH. **1958**. The structure of mangostin. *J Am Chem Soc* 80:1691-1700.

Yamaguchi LF, Lago JH, Tanizaki TM, Mascio PD, Kato MJ. **2006**. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry* 67:1838-1843.

Zeitz O, Maass E, Nguyen PV, Hensmann G, Kogler H, Moller K, Hasenfuss G, Janssen P. **2002**. Hydroxyl radical-induced acute diastolic dysfunction is due to calcium overload via reverse-mode Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circ Res* 90:988-995.