



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LA  $\alpha$ -MANGOSTINA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

EVA GUADALUPE NOLASCO AMAYA



MÉXICO D.F.,

2008



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 Profesor BERNARDO LUCAS FLORENTINO

Vocal Profesor JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

Secretario Profesora INOCENCIA MARÍA DE LOURDES FLORES

1er Suplente Profesora ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

2° Suplente Profesora VANESA MAYA AMPUDIA

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 209 del Departamento de Biología Edificio F de la  
Facultad de Química de la UNAM, México D. F.,

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

---

Dr. José Pedraza Chaverri  
Asesor del Tema

---

M. en C. Omar Noel Medina Campos  
Supervisor técnico

---

Eva Gpe. Nolasco Amaya  
Sustentante

## AGRADECIMIENTOS

A mi querida mamá por darme la vida, por ser mamá y papá, por quererme tanto aún con todos mis errores, por su paciencia, apoyo y comprensión durante mis momentos de duda. “Abuela” te quiero mucho y este logro es por y para tí. ¡Muchas gracias!.

A Pilar Sánchez Gómez por sus enseñanzas, consejos, confianza y apoyo pero sobre todo por su amistad durante todos estos años. Pily doy gracias a Dios por haber cruzado nuestros caminos. Esto también es por tí. ¡Te quiero mucho y mil gracias por todo!.

Al Dr. José Pedraza Chaverri por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y por todos los conocimientos que me transmitió.

Al M en C. Omar Medina Campos por ser mi profesor durante el desarrollo de este proyecto y por todas sus contribuciones para la realización del mismo.

A Erika, Fernando y Perla por su colaboración y apoyo en la realización de este trabajo.

A Carolina, Dairo, Elvia, Erika, Fernando, Jazmín, Laura, Mabel, Marisol, Noemí, Perla, Sabina, Silvia, Susana y Tino por su apoyo y contribuciones para este trabajo pero sobre todo por su amistad. Gracias por todos sus consejos.

A mis amigos de la facultad: Adriana, Aída, Carolina, Diana, Eduardo, Fidel, Isaura, Ivette, Karla, Maribel, Mayell, Pilar, Rocío, Sonia, Tere, Yazmín, Yehimi, Valentina, Viviana y a los “amigos por un tiempo” con los que compartí las aulas, pues no terminaría de mencionarlos a todos. ¡Gracias por compartir los buenos y malos momentos en nuestra segunda casa la Facultad de Química!

A la Facultad de Química por haberme abierto sus puertas y por todos los conocimientos adquiridos y actividades desarrolladas. A sus profesores por su dedicación y esfuerzos por transmitir el conocimiento. ¡Gracias!

**Existen personas en nuestras vidas** que nos hacen felices por la simple casualidad de haberse cruzado en nuestro camino. Algunas recorren el camino a nuestro lado, viendo muchas lunas pasar, mas otras apenas vemos entre un paso y otro. A todas **las llamamos amigos** y hay muchas clases de ellos.

Tal vez cada hoja de un árbol caracteriza uno de nuestros amigos. El primero que nace del brote es nuestro amigo papá y **nuestra amiga mamá**, que nos muestra lo que es la vida. Después vienen **los amigos hermanos**, con quienes dividimos nuestro espacio para que puedan florecer como nosotros. Pasamos a conocer a toda **la familia** de hojas a quienes respetamos y deseamos el bien.

Más el destino nos presenta a otros amigos, los cuales no sabíamos que irían a cruzarse en nuestro camino. A muchos de ellos los denominamos **amigos del alma**, de corazón. Son sinceros, son verdaderos. Saben cuando no estamos bien, saben lo que nos hace feliz. Y a veces uno de esos amigos del alma estalla en nuestro corazón y entonces es llamado un **amigo enamorado**. Ese da brillo a nuestros ojos, música a nuestros labios, saltos a nuestros pies.

Más también hay de aquellos **amigos por un tiempo**, tal vez unas vacaciones o unos días o unas horas. Ellos acostumbran a colocar muchas sonrisas en nuestro rostro, durante el tiempo que estamos cerca. Hablando de cerca, no podemos olvidar a **amigos distantes**, aquellos que están en la punta de las ramas y que cuando el viento sopla siempre aparecen entre una hoja y otra.

El tiempo pasa, el verano se va, el otoño se aproxima y perdemos algunas de nuestras hojas, algunas nacen en otro verano y otras permanecen por muchas estaciones. Pero lo que nos deja más felices es que las que cayeron continúan cerca, alimentando nuestra raíz con alegría. Son recuerdos de momentos maravillosos de cuando se cruzaron en nuestro camino.

Te deseo, hoja de mi árbol, PAZ, AMOR Y SALUD. Hoy y siempre.

Simplemente porque **cada persona que pasa en nuestra vida es única**. Siempre deja un poco de si y se lleva un poco de nosotros. Habrá los que se llevarán mucho, pero no habrá de los que no nos dejaran nada. Esta es la mayor responsabilidad de nuestra vida y la prueba evidente de que dos almas no se encuentran por casualidad.

José Luis Borges

## TABLA DE CONTENIDO.

<b>1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
1.1 El mangostán.....	3
1.2 Xantonas del mangostán.....	4
1.3 $\alpha$ -mangostina.....	5
1.4 El oxígeno.....	9
1.4.1 Toxicidad del oxígeno.....	10
1.4.2 Las especies reactivas de oxígeno (EROs).....	10
1.4.3 Daño producido por las EROs.....	14
1.4.4. Defensas antioxidantes contra las EROs.....	16
1.4.5. Estrés oxidante.....	18
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 Objetivo general .....	20
3.2 Objetivo particular:.....	20
<b>4. MATERIALES.....</b>	<b>21</b>
<b>5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>22</b>
5.1 Determinación de la capacidad atrapadora de $H_2O_2$ <i>in vitro</i> .....	22
5.2 Determinación de la capacidad atrapadora de $OH^\bullet$ <i>in vitro</i> .....	23
5.3 Determinación de la capacidad atrapadora de $O_2^{\bullet-}$ <i>in vitro</i> .....	24
5.4 Determinación de la capacidad atrapadora de $^1O_2$ <i>in vitro</i> .....	25
5.5 Determinación de la capacidad atrapadora de $ONOO^-$ <i>in vitro</i> .....	27
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
6.1 Determinación de la capacidad atrapadora de $H_2O_2$ .....	29
6.2 Determinación de la capacidad atrapadora de $OH^\bullet$ .....	31
6.3 Determinación de la capacidad atrapadora de $O_2^{\bullet-}$ .....	34
6.4 Determinación de la capacidad atrapadora de $^1O_2$ .....	37
6.5 Determinación de la capacidad atrapadora de $ONOO^-$ .....	38
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>44</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>45</b>

## RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) causan daño oxidante a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos promoviendo así el desarrollo de enfermedades como cáncer, artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares y numerosas enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Alzheimer y enfermedad del Parkinson. El consumo de frutas y verduras puede reducir la incidencia de dichas enfermedades debido a la presencia de antioxidantes, los cuales retrasan o inhiben las reacciones en cadena de la oxidación de moléculas orgánicas.

El mangostán (*Garcinia mangostana Linn*), miembro de la familia Guttiferae, es un árbol que se cultiva en bosques tropicales del sudeste de Asia en donde su fruto constituye parte de la medicina tradicional. El pericarpio o cáscara del mangostán es una fuente de xantonas y otras sustancias que poseen actividades biológicas como antioxidante, antitumoral, antialérgica, antiinflamatoria, antibacteriana, fungicida y antiviral.

La  $\alpha$ -mangostina fue la primera xantona aislada del pericarpio del mangostán, que también puede obtenerse de la corteza y el látex. Respecto a su capacidad antioxidante se ha informado que disminuye la oxidación *in vitro* de lipoproteínas de baja densidad inducida por cobre o por radicales peroxilo y que tiene capacidad atrapadora sobre peroxinitrito. Sin embargo, no se ha caracterizado la capacidad antioxidante específica para las EROs por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad atrapadora específica de  $\alpha$ -mangostina sobre las siguientes EROs: peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ), anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) y anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), la cual se expresó como  $CI_{50}$  (concentración del antioxidante necesaria para atrapar o inhibir el 50% de la ERO presente o generada en cada ensayo). Estos valores se compararon con los de diferentes antioxidantes de referencia.

La  $\alpha$ -mangostina no presentó capacidad atrapadora sobre las siguientes especies:  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$ ,  $^1O_2$ , pero sí sobre  $O_2^{\bullet-}$  ( $CI_{50} = 24.8 \pm 0.7 \mu M$ ,  $n=6$ ) sin embargo fue menos efectiva que el compuesto de referencia, el ácido nordihidroguayarático ( $CI_{50} = 6.5 \pm 0.4 \mu M$ ,  $n=6$ ) y también presentó capacidad atrapadora sobre  $ONOO^-$  ( $CI_{50} = 28.8 \pm 0.7 \mu M$ ,  $n=9$ ) siendo igual de efectiva que el compuesto de referencia, la penicilamina ( $CI_{50} = 23.3 \pm 2.9 \mu M$ ,  $n=5$ ).

De acuerdo a los resultados de este estudio,  $\alpha$ -mangostina atrapa únicamente  $O_2^{\bullet-}$  y  $ONOO^-$ , pero es importante aclarar que la toxicidad de estas especies se debe principalmente a la generación de especies más oxidantes como  $OH^\bullet$  que es considerada la especie oxidante más dañina, por lo que los efectos benéficos del mangostán sobre la salud pueden deberse, o relacionarse, al menos en parte, con su actividad antioxidante hacia  $O_2^{\bullet-}$  y  $ONOO^-$ .

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 El mangostán.

La fruta del mangostán (*Garcinia mangostana* Linn), un árbol miembro de la familia Guttiferae, es llamada la “reina de las frutas” por su calidad reconocida en color, sabor y olor. El árbol es de lento crecimiento, tiene hojas coriáceas, puede llegar a medir 6-25 m de altura y se cultiva en bosques tropicales, es originario del sudeste de Asia, probablemente de Malasia, pero actualmente entre los países productores se encuentran India, Myanmar, Sri Lanka, Tailandia, Filipinas, Brasil y otros países centroamericanos y asiáticos.



Figura 1. Fruta del mangostán.

Los frutos son redondos, de color púrpura oscuro a rojizo cuando es maduro, mide de 4-7 cm de diámetro y pesa de 55-75 g (Figura 1). La corteza o el pericarpio, de aproximadamente 1 cm de grosor, rodea la parte comestible, que consiste en 5-7 segmentos de pulpa casi traslúcida, blanca, suave y jugosa con un sabor dulce ligeramente ácido.

El pericarpio de la fruta ha sido usado desde hace muchos años como parte de la medicina tradicional en el sudeste de Asia para el tratamiento de infecciones de la piel, heridas, disentería, diarrea (Ji et al., 2007, Weecharangsan et al., 2006, Jung et al., 2006) y como antiinflamatorio (Gopalakrishnan et al., 1997).

Diversos estudios experimentales han demostrado que extractos del mangostán poseen actividad (a) antibacteriana: inhibe el crecimiento de *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* implicados en el desarrollo del acné (Chomnawang et al., 2007), (b) antioxidante: capacidad atrapadora eficaz de radicales libres (Weecharangsan et al., 2006), (c) presenta actividad antiproliferativa y apoptótica en líneas celulares de cáncer de mama humano (SKBR3) (Moongkarndi et al., 2004a), (d) actividad neuroprotectora (Weecharangsan et al., 2006), y (e) antialérgica y antiinflamatoria (Kanati et al., 2002).

Respecto a la actividad antioxidante González-Cuahutencos (2007) evaluó la capacidad antioxidante de un extracto acuoso de la cáscara del mangostán y del jugo comercial del mangostán “XanGo™” sobre las siguientes especies reactivas:  $^1O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$ , HOCl,  $H_2O_2$  y



ONOO<sup>-</sup>. Encontró el siguiente orden de eficacia de atrapamiento para el extracto de la cáscara de mangostán O<sub>2</sub><sup>•-</sup> > ONOO<sup>-</sup> > HOCl > <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y para el XanGo<sup>TM</sup> O<sub>2</sub><sup>•-</sup> > ONOO<sup>-</sup> > HOCl. También encontró que el extracto de la cáscara del mangostán es más efectivo para atrapar las especies estudiadas que el XanGo<sup>TM</sup> y demostró que ambos no tienen la capacidad para atrapar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y que además el XanGo<sup>TM</sup> no tiene la capacidad de atrapar <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Como perspectivas consideró 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.

En el mangostán se han identificado diferentes compuestos como antocianinas, benzofenonas glicosiladas (Jinsart et al., 1992; Huang et al., 2001; Nguyen et al., 2005), taninos (Moongkarndi et al., 2004b), pectinas, resinas, látex (Garrity et al., 2004) y los principales metabolitos secundarios más abundantes son las xantonas (Ji et al., 2007; Jung et al., 2006) cuya variedad y concentración aumentan con la maduración de la fruta (Nagy y Shaw, 1980).

Al estudiar las propiedades medicinales del mangostán, en algunos trabajos, se han aislado compuestos biológicamente activos (Jung et al., 2006; Suksamrarn et al., 2003 Suksamrarn et al., 2006; Sakagami et al., 2005) que en su mayoría son xantonas y que son de interés debido a su variedad de beneficios sobre la salud (Garrity et al., 2004).

## 1.2 Xantonas del mangostán.

Las xantonas son metabolitos secundarios que se encuentran comúnmente en algunas familias de plantas superiores, en hongos y en líquenes (Vieira y Kijjoa, 2005). El núcleo de las xantonas, conocido como 9-xantenona o dibenzo y pirona (Figura 2), es simétrico y está sustituido en diferentes posiciones lo que da lugar a una gran variedad de estructuras químicas con actividades farmacológicas y biológicas (Pinto et al., 2005).

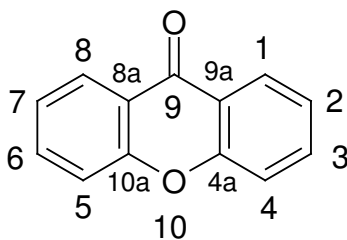


Figura 2. Núcleo de las xantonas

En diversos estudios fitoquímicos se ha encontrado que el mangostán contiene una variedad de metabolitos secundarios entre los que se encuentran las xantonas preniladas y oxigenadas (Matsumoto et al., 2005). Las xantonas han sido aisladas del pericarpio, de la fruta completa, del tronco del árbol y de las hojas. También se ha reportado que presentan actividades biológicas muy importantes por ejemplo antibacteriana (Inhuma et al., 1996; Chomnawang et al., 2005), fungicida (Gopalakrishnan et al., 1997), antioxidante (Williams et al., 1995; Jung et al., 2006), antitumoral (Matsumoto et al., 2005) y antiinflamatoria (Shankaranaraya et al., 1979; Chairungrilerd et al., 1996a,b). Entre las xantonas más estudiadas (Figura 3) se encuentran las  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -mangostinas, garcinona E, 8 desoxigartanina, y gartanina.

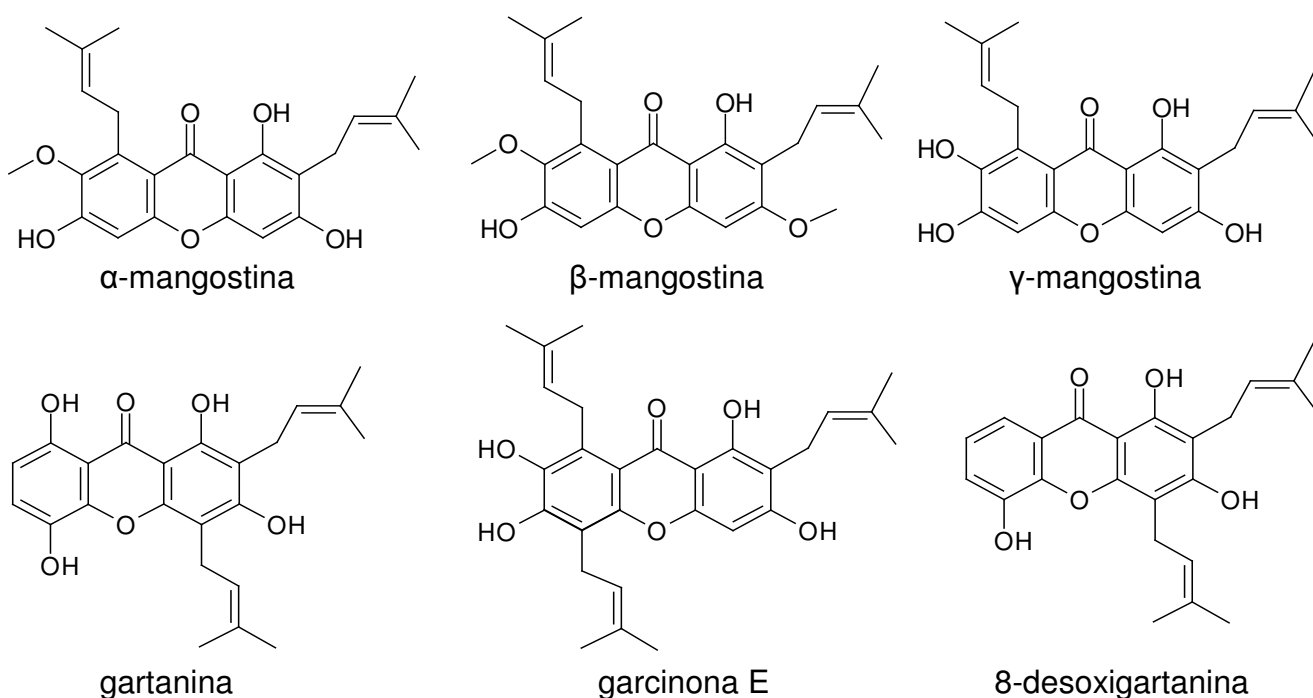


Figura 3. Algunas xantonas del mangostán.

### 1.3 $\alpha$ -mangostina.

La  $\alpha$ -mangostina (Figura 4) es la xantona presente en mayor concentración en la fruta del mangostán (Walker E, 2007; Mahabusarakam et al., 2006). Fue aislada por primera vez en 1855 del pericarpio del mangostán y se le dio el nombre de mangostina (posteriormente  $\alpha$ -mangostina). En 1930 Dragendorff y en 1932 Murakami comenzaron a dilucidar su estructura (Wan, 1973); sin embargo Yates y Stout (1958) fueron los primeros en proponer la correcta fórmula molecular, establecieron su actividad óptica, la naturaleza y posición de las cadenas laterales y vías de degradación. Además encontraron que  $\alpha$ -mangostina es el residuo de

color amarillo obtenido del pericarpio de la fruta del mangostán y que se puede aislar de diversas partes como la corteza, el látex y de diversas partes del árbol del mangostán (Jefferson et al., 1970; Govindachari et al., 1971; Mahabusarakam et al., 1987). En 1968 Stout et al. presentan evidencias experimentales que confirman la estructura propuesta.

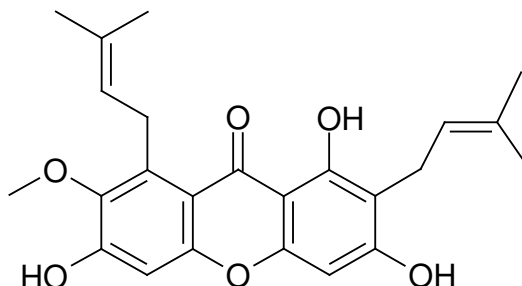


Figura 4. Estructura de  $\alpha$ -mangostina

En diversos estudios se ha demostrado que esta molécula tiene actividades biológicas muy importantes entre las que se encuentran:

#### **Propiedades antialérgicas y antiinflamatorias.**

Los primeros estudios farmacológicos de  $\alpha$ -mangostina muestran que su administración oral e intraperitoneal tiene actividad antiinflamatoria en ratas en las que se indujo edema con carragenina (Shankaranarayan et al., 1979). Chairungsrilerd et al. (1996a) demostraron en aorta de conejo que  $\alpha$ -mangostina es un agente bloqueador de receptores histaminérgicos, porque inhibe las contracciones inducidas por histamina. También demostraron que es un antagonista competitivo del receptor  $H_1$  en células del músculo liso (Chairungsrilerd et al., 1996b) dado que inhibe las contracciones inducidas por histamina de forma dependiente de la concentración en presencia o ausencia de cimetidina, un antagonista del receptor de  $H_2$  de histamina, pero no afecta el estado de relajación en aorta de conejo ni en tráquea de cobayo inducida por la estimulación de los receptores  $H_2$  de histamina y en las células del músculo liso de aorta de rata inhibe de manera dependiente de la concentración la unión de [ $^3H$ ]mepiramina, un antagonista específico para el receptor de histamina  $H_1$ .

#### **Propiedades antibacterianas y fungicidas.**

Linuma et al. (1996) estudiaron los efectos inhibitorios de diversas xantonas aisladas del pericarpio de la fruta del mangostán contra el crecimiento de *Staphylococcus aureus*

resistente a meticilina (MRSA por sus siglas en inglés). Se encontró que  $\alpha$ -mangostina tuvo la mayor actividad inhibitoria con un valor de concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) MIC = 1.57 a 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Suksamrarn et al. (2003) probaron el potencial antituberculoso de xantonas preniladas del pericarpio de la fruta del mangostán. La  $\alpha$ -mangostina exhibió un fuerte efecto inhibitorio contra ***Mycobacterium tuberculosis*** con un valor de MIC = 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Sakagami et al. (2005) encontraron que  $\alpha$ -mangostina fue activa contra ***Enterococcus*** resistentes a vancomicina (VRE por sus siglas en inglés) y MRSA, con valores de MIC = 6.25 y 6.25-12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. También observaron un sinergismo entre  $\alpha$ -mangostina y gentamicina contra VRE y  $\alpha$ -mangostina e hidrocloreuro de vancomicina contra MRSA y un sinergismo parcial entre  $\alpha$ -mangostina y los antibióticos ampicilina y minociclina.

Gopalakrishnan et al. (1997) demostraron la actividad fungicida de varias xantonas aisladas del pericarpio de la fruta del mangostán y algunas xantonas derivadas de  $\alpha$ -mangostina contra tres hongos fitopatógenos ***Fusarium oxysporum vasinfectum***, ***Alternaria tenuis***, y ***Dreschlera oryzae***. La  $\alpha$ -mangostina presentó una actividad inhibitoria contra los tres hongos a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 ppm en el medio.

### **Propiedades antitumorales.**

Matsumoto et al. (2003) examinaron el efecto inhibitorio de seis xantonas del pericarpio de la fruta del mangostán sobre el crecimiento en una línea celular de leucemia humana HL60. Se examinaron los efectos citotóxicos después de 72 h de incubación con las xantonas a concentraciones de 5 a 40  $\mu\text{M}$ . Aunque todas las xantonas exhibieron una inhibición significativa del crecimiento,  $\alpha$ -mangostina fue más eficaz incluso a dosis más baja de 10  $\mu\text{M}$  (a 10  $\mu\text{M}$  se logró una completa inhibición). También se evaluó el efecto de  $\alpha$ -mangostina en el crecimiento de diferentes tipos de líneas celulares de leucemia (K562, NB4 y U937); aunque no presentó efecto significativo sobre el crecimiento celular a dosis menores a 2  $\mu\text{M}$ , sí inhibió el crecimiento de todas las líneas celulares a 5 $\mu\text{M}$ . A una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -mangostina, inhibió marcadamente el crecimiento de todas las líneas celulares estudiadas, especialmente de HL60, NB4 y U937.

Se ha examinado los efectos protectores de  $\alpha$ -mangostina en lesiones preneoplásicas en carcinogénesis de colon de rata inducidas por la inyección subcutánea de 1,2-dimetilhidracina (40 mg/Kg de peso corporal). Se demostró que la administración diaria de  $\alpha$ -

mangostina en el alimento a concentraciones de 0.02% y 0.05% durante cinco semanas inhibió en forma significativa la inducción y el desarrollo de dichas lesiones (Nabandith et al., 2004).

Matsumoto et al. (2005) investigaron los efectos antiproliferativos de cuatro xantonas preniladas, entre ellas  $\alpha$ -mangostina en células de cáncer de colon humano DLD-1 y se encontró que tres xantonas, incluyendo  $\alpha$ -mangostina, inhiben fuertemente el crecimiento de las células a una concentración de 20  $\mu$ M y su eficacia antitumoral se correlacionó con el número de grupos hidroxilo. También se demostró que los efectos antiproliferativos de  $\alpha$ -mangostina están asociados con la inducción de apoptosis.

Al evaluar las propiedades antitumorales de xantonas aisladas del mangostán entre ellas  $\alpha$ -mangostina, en lesiones preneoplásicas de un cultivo de glándula mamaria de ratón inducidas por 7,12 dimetilbenz(a)antraceno, se encontró que  $\alpha$ -mangostina inhibe el 50% de las lesiones preneoplásicas a una concentración ( $IC_{50}$ ) de 1.0  $\mu$ g/mL (2.44  $\mu$ M) (Jung et al., 2006).

Suksamrarn et al. (2006) evaluaron las propiedades citotóxicas de xantonas aisladas del pericarpio de la fruta del mangostán contra tres líneas celulares de cáncer humano, carcinoma epidermoide de la boca (células KB), cáncer de mama (células BC-1) y cáncer de pulmón (células NCI-H187). La  $\alpha$ -mangostina exhibió el efecto más potente contra células BC-1 con un valor de  $IC_{50}$  de 0.92  $\mu$ g/mL, en comparación con la actividad presentada por el fármaco elipticina ( $IC_{50} = 1.46 \mu$ g/mL); también tuvo un efecto citotóxico contra las células KB ( $IC_{50} = 2.08 \mu$ g/mL) y NCI-H187 ( $IC_{50} = 2.87 \mu$ g/mL).

La  $\alpha$ -mangostina también poseen actividad antimalárica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* con un valor  $IC_{50} = 5.1 \mu$ M (Riscoe et al., 2005).

### **Propiedades antioxidantes.**

Fan & Su (1997) caracterizaron las propiedades antioxidantes de  $\alpha$ , y  $\gamma$ -mangostinas obtenidas del extracto metanólico de la fruta del mangostán. y la compararon con la actividad antioxidante de otros compuestos antioxidantes. Utilizando el método del tiocianato férrico encontraron el siguiente orden de eficacia antioxidante:  $\gamma$ -mangostina>butilhidroxianisol> $\alpha$ -tocoferol> $\alpha$ -mangostina (Pedraza-Chaverri et al., 2008).

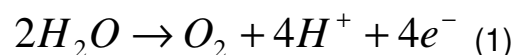
Williams et al. (1995) encontraron que  $\alpha$ -mangostina disminuye la oxidación, inducida por cobre o por radical peroxilo, de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) aisladas de plasma humano. Ellos midieron la oxidación de las LDL por la producción de dienos conjugados a 234 nm, por la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (una medida de la oxidación de los lípidos) y por el consumo de  $\alpha$ -tocoferol y encontraron que  $\alpha$ -mangostina disminuye la oxidación de las LDL, (a) prolonga la fase de latencia (fase lag), (b) disminuye la producción de TBARS y (c) disminuye el consumo de  $\alpha$ -tocoferol inducido por la oxidación de las LDL.

Por otra parte, Jung et al. (2006) midieron la capacidad atrapadora de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) de 14 xantonas aisladas del pericarpio de *Garcinia mangostana* mediante la oxidación del compuesto no fluorescente dihidrorodamina 123 (DHR123) por  $\text{ONOO}^-$  y reportaron que  $\alpha$ -mangostina, junto con 4 xantonas más, presentó la actividad antioxidante más eficaz con un valor de  $\text{IC}_{50} = 12.2 \mu\text{M}$ ; el resto de las xantonas presentaron un valor de  $\text{IC}_{50}$  en el intervalo 2.2 a 26.4  $\mu\text{M}$  y utilizaron como referencia el compuesto DL-penicilamina  $\text{IC}_{50} = 3.1 \mu\text{M}$ .

#### 1.4 El oxígeno.

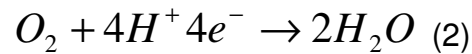
El oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) o dioxígeno (porque son dos átomos de oxígeno atómico unidos por un enlace covalente) es uno de los gases más importantes de la Tierra. Constituye el 21% de la atmósfera, 89% del peso del agua del mar y al menos el 47% de la corteza terrestre. Tiene dos electrones desapareados, este tipo de estructura es llamado estado basal o estado triplete y significa que el oxígeno es un birradical; sin embargo estos dos electrones se encuentran en giro paralelo, lo que dificulta tomar dos electrones libres con giro antiparalelo a la vez, por ello sólo puede recibir estos electrones de uno en uno para cada orbital molecular externo. Esto explica porqué en su estado basal y a temperatura ambiente el oxígeno reacciona muy poco y además requiere metales (hierro, cobre) o metaloproteínas con hierro o cobre principalmente (con grupo hemo), que actúan como catalizador en sus reacciones (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

El  $\text{O}_2$  atmosférico es producto de la oxidación del agua (reacción 1) llevada a cabo por el fotosistema II de las células fotosintéticas durante la fotosíntesis (Hansberg, 2002).



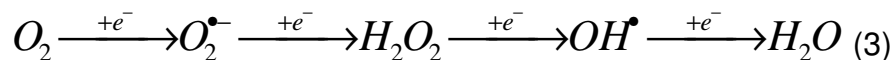
En los organismos aerobios, el oxígeno es el último aceptor de electrones en la cadena

respiratoria en donde se forma agua. La enzima citocromo c oxidasa, en el complejo IV de transporte de electrones, reduce completamente el oxígeno a agua (reacción 2) por la adición de cuatro protones y 4 electrones.



Estos dos procesos establecen un ciclo entre los organismos productores y consumidores de oxígeno.

A la adición sucesiva de electrones a la molécula de oxígeno se le conoce como reducción univalente (reacción 3), produciéndose así especies parcialmente reducidas de oxígeno.



#### 1.4.1 Toxicidad del oxígeno.

La toxicidad del oxígeno se explica debido a la formación de las especies reactivas de oxígeno (EROs). Estas especies son más reactivas que el oxígeno en su estado basal de triplete. Las principales especies son: (a) las que se producen por la ruptura o la excitación del oxígeno: oxígeno atómico(O), ozono(O<sub>3</sub>) y oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) y (b) las especies parcialmente reducidas: anión superóxido(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), peróxido de hidrógeno(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>) (Hansberg, 2002).

#### 1.4.2 Las especies reactivas de oxígeno (EROs).

Un radical libre 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). Se pueden formar por diversos mecanismos como ganancia o pérdida de un electrón de un no radical o por la ruptura homolítica de una molécula. Son altamente reactivos, así como inestables, y tienen a remover un electrón de otras moléculas para obtener estabilidad y de esta manera pueden adicionarse a otra molécula, actuar como agente reductor (se oxida), como agente oxidante (se reduce) o puede abstraer un H<sup>+</sup> de las uniones carbono-hidrógeno (C-H) como en los lípidos (Halliwell, 2006).

Los radicales libres más importantes desde el punto de vista biológico son los derivados del oxígeno y del nitrógeno principalmente.

La expresión “especies reactivas de oxígeno” es un término colectivo que involucra no sólo radicales libres derivados del oxígeno, sino también a los no radicales derivados de la reducción molecular del oxígeno y que además son muy reactivos, como el  $H_2O_2$  y el ácido hipocloroso (HOCl) (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

Toda célula genera EROs continuamente pero no todas las reacciones en las que participan son del todo nocivas, pues son esenciales para la vida debido a que están involucradas en funciones “fisiológicas” importantes como las de transducción de señales, neurotransmisión, relajación del músculo liso, agregación plaquetaria, control del sistema inmune, producción de energía, fagocitosis, señalización celular, entre otras (Gomes et al., 2005). En el músculo liso vascular controlan el crecimiento de las células musculares y el aumento de su concentración puede generar hipertrofia (Obregón, 2008). Forman parte del sistema de defensa en las células fagocíticas (Diplock, 1994); sin embargo cuando se encuentran a altas concentraciones pueden generar daño al causar la oxidación de moléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El balance entre las sustancias pro-oxidantes y las antioxidantes es el que determina sus funciones fisiológicas o patológicas.

A continuación se describen algunas EROs de interés para este trabajo:

### **OXÍGENO SINGULETE ( $^1O_2$ ).**

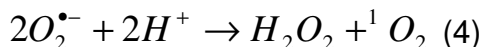
Cuando uno de los electrones desapareados del oxígeno absorbe energía e invierte su rotación (giro), se forma el  $^1O_2$ . Existen dos formas del oxígeno singulete: la sigma ( $\Sigma$ ) que es un radical libre, debido a que conserva los dos electrones desapareados en los orbitales moleculares externos  $2\pi^*$  (cada electrón en un orbital) como en el caso del dioxígeno, la diferencia radica en que el electrón tiene giro antiparalelo, y la delta ( $\Delta$ ), la cual también posee dos electrones, aunque en este caso se encuentran apareados en un solo orbital  $2\pi^*$ , por lo que no es un radical libre ya que no posee ningún electrón desapareado (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza Chaverri, 2006).

Se ha estimado su vida media  $10^{-6}$  s dependiendo de la naturaleza de la matriz que se encuentre a su alrededor, puede interactuar con otras moléculas por la transferencia de su energía de excitación o por combinación química (Diplock et al., 1998), es capaz de reaccionar con la mayoría de los compuestos celulares. (Hansberg, 2002). Puede oxidar



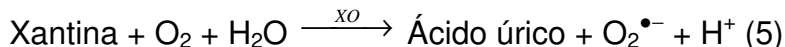
directamente proteínas, DNA y lípidos (Halliwell, 2006). Los blancos preferenciales para reaccionar químicamente son compuestos con dobles ligaduras, ácidos grasos poliinsaturados o bases de DNA como la guanina (Diplock et al., 1998).

De la misma forma, la formación de  $^1O_2$  es llevada a cabo por fagocitos activados (reacción 4), los cuales son células que forma parte del sistema inmunológico de los seres vivos (por ejemplo los monocitos y macrófagos) y que son estimuladas cuando ya existe o hay posibilidad de daño a las células (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza Chaverri, 2006).

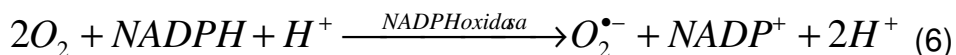


### **ANIÓN SUPERÓXIDO ( $O_2^{\bullet-}$ ).**

Esta especie es producida por diversos sistemas enzimáticos como NADPH oxidasa, xantina oxidasa (degradación de purinas) (reacción 5), ciclooxigenasa y lipooxigenasa, óxido nítrico sintasa y citocromo P450; por reacciones de autooxidación y por vía no enzimática por la transferencia de electrones que reducen de forma univalente al  $O_2$ , es decir cuando acepta un electrón. En solución acuosa puede oxidar al ácido ascórbico, reduce a los complejos de hierro tal como la citocromo c y el ácido férrico-etilendiamino-tetraacético ( $Fe^{3+}$  EDTA) (Aruoma, 1994b).

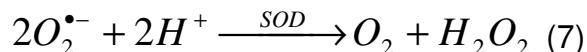


El  $O_2^{\bullet-}$  forma parte de la defensa inmune primaria del organismo ya que las células fagocíticas como monocitos y macrófagos producen grandes cantidades de esta especie como mecanismos de defensa contra organismos extraños (Diplock et al., 1998). Cuando estas células se activan, el complejo enzimático de la NADPH oxidasa localizado en la membrana citoplasmática, reduce parcialmente al  $O_2$  generando  $O_2^{\bullet-}$  en grandes cantidades (reacción 6).



### **PERÓXIDO DE HIDRÓGENO ( $H_2O_2$ ).**

La mayor parte de esta especie proviene de la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (reacción 7).



Aunque no es un radical libre y es poco reactivo, puede difundir a través de los

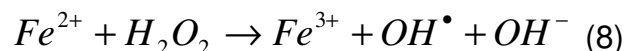
compartimentos celulares y reaccionar con el  $O_2^{\bullet-}$  en presencia de metales de transición, para generar el  $OH^\bullet$ . Por esta razón se le considera un oxidante importante en las células de los organismos aerobios. Un grupo de flavoenzimas localizadas en el retículo endoplasmático del hígado y el riñón son importantes en el metabolismo de los aminoácidos y producen  $H_2O_2$  (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza Chaverri, 2006).

Tiende a formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. Algunas enzimas, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o la fructosa-1,6-difosfato fosfatasa del cloroplasto se inactivan con el  $H_2O_2$ . Reacciona lentamente con algunos cetoácidos como el piruvato o el  $\alpha$ -cetoglutarato (Hansberg, 2002).

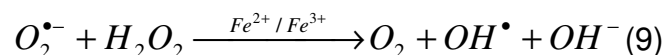
A bajas concentraciones el  $H_2O_2$  es poco reactivo, sin embargo, a altas concentraciones es capaz de oxidar los grupos  $-SH$  de las proteínas y causar ruptura de las hebras del ADN.

### **RADICAL HIDROXILO ( $OH^\bullet$ ).**

Esta especie se puede formar por la radiación de alta energía como los rayos X, por división homolítica de la molécula de agua o cuando el  $H_2O_2$  acepta un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición como el  $Fe^{2+}$  o el  $Cu^+$ , se forma el  $OH^\bullet$  y el ión hidroxilo ( $OH^-$ ) (reacción de Fenton, reacción 8). Este último es inocuo, se protona para formar agua; en cambio el  $OH^\bullet$  es considerado una de las especies oxidantes más dañinas y se estima que tiene una vida media ( $10^{-9}$ s). La luz ultravioleta puede dividir al  $H_2O_2$  y producir dos moléculas de  $OH^\bullet$ . La alta reactividad de este radical implica la reacción inmediata en el lugar donde fue generado (Diplock et al., 1998).



La reacción del  $H_2O_2$  con el  $O_2^{\bullet-}$  puede formar  $OH^\bullet$  vía reacción Haber-Weiss (reacción 9) (Cheng et al., 2002).



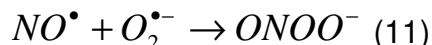
También se puede formar a partir del ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (reacción 10).



### **ANIÓN PEROXINITRITO ( $ONOO^-$ ).**

Este anión puede formarse por la combinación del radical óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ) y  $O_2^{\bullet-}$  (reacción 11). El  $ONOO^-$  es un potente oxidante que induce nitración de tirosina, lipoperoxidación y

citotoxicidad. Se ha encontrado involucrado en varios estados patológicos (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza Chaverri, 2006).



Durante su descomposición a pH fisiológico, el  $ONOO^{-}$  puede producir algunos radicales libres que son oxidantes fuertes (Figura 5). Estos productos se forman por dos mecanismos. El primero implica la protonación del  $ONOO^{-}$  para formar el ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ), el cual experimenta una descomposición homolítica y genera dos radicales,  $OH^{\bullet}$  y dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\bullet}$ ), que son altamente reactivos. El segundo mecanismo es la reacción entre el  $ONOO^{-}$  y el dióxido de carbono ( $CO_2$ ) para formar nitrosoperoxocarbonato ( $ONOOCO_2^{-}$ ), el cual se descompone para dar  $NO_2^{\bullet}$  y radical carbonato ( $CO_3^{\bullet-}$ ) (Xiong et al., 2007).

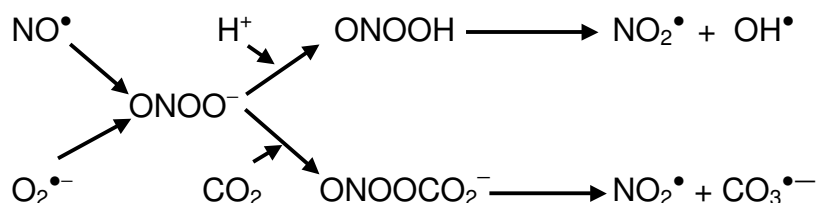


Figura 5. Formación  $ONOO^{-}$  y sus productos de descomposición. Xiong et al., 2007.

### 1.4.3 Daño producido por las EROs.

Hay tres principales blancos de ataque de los radicales libres en las células:

#### ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO (ADN).

Reaccionan con la desoxirribosa y con las bases nitrogenadas, éstas pueden generar mutaciones que a su vez pueden resultar en carcinogénesis, apoptosis, necrosis y enfermedades hereditarias. En relación con esto, se han detectado más de 20 tipos de modificaciones estructurales de las bases (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). Existen mecanismos de reparación del ADN que consisten en una amplia gama de enzimas que se activan cuando hay modificaciones y reconocen las anomalías en el ADN; reparan el daño eliminándolo por escisión, resíntesis y reincorporación de filamento del DNA (Halliwell y Cross, 1994).

#### LÍPIDOS.

El efecto principal es la lipoperoxidación, que se produce al contacto con los lípidos de la

membrana con un agente oxidante, como cualquiera de las EROs. En esta reacción el radical libre inicia la reacción de oxidación en cadena de un lípido, formando un lípido hidroperoxidado y un radical alquilo. El alquilo reacciona con una molécula de oxígeno y regenera la especie inicial, constituyendo una reacción en cadena (cíclica). Esta lipoperoxidación trae como consecuencia alteraciones en la estructura de la membrana, afectando su fluidez y provocando daño en su integridad. La peroxidación de los lípidos genera especies como el malondialdehído y el 4-hidroxi-2-nonenal, los cuales son considerados citotóxicos, ya que pueden funcionar como agentes electrofílicos capaces de interactuar con otros compuestos celulares, principalmente proteínas y ADN. Cabe mencionar que la lipoperoxidación es un proceso identificado en enfermedades cardiovasculares. Uno de los procesos importantes es la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, efecto que se ha correlacionado con la arterosclerosis (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

### **PROTEÍNAS.**

Los efectos son la oxidación de residuos de los aminoácidos, el rompimiento de los enlaces peptídicos y la agregación entre proteínas. Este daño conduce a una modificación en su estructura, provocando la pérdida de la actividad catalítica para finalmente interrumpir la regulación de las vías metabólicas. Los sistemas de reparación se limitan 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 (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

Las proteínas también son susceptibles al ataque por parte de los intermediarios o productos finales producidos por el daño de las EROs sobre los lípidos, como es el caso del 4-hidroxinonenal. Las proteínas dañadas por estrés oxidante no deben ser consideradas como productos finales, ya que éstas son capaces de dañar otras biomoléculas (Olivares-Corichi et al., 2006).

Los efectos de las EROs han sido implicados en numerosas condiciones clínicas como: lesión por isquemia-reperfusión, cáncer, envejecimiento, defectos en glóbulos rojos (paludismo, anemia), artritis reumatoide, enfermedad de Parkinson, retinopatía, daño retinal degenerativo (Aruoma, 1996), enfermedades cardiovasculares, diabetes y arteriosclerosis

(Yokoyama, 2004), enfermedades pulmonares como el síndrome de insuficiencia respiratoria progresiva, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma (Sierra et al., 2004).

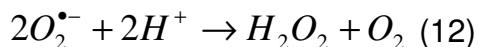
#### 1.4.4. Defensas antioxidantes contra las EROs

La prevención del daño por las EROs es de gran importancia pues como ya hemos visto éstas se producen continuamente en nuestro organismo como parte del metabolismo celular; sin embargo también se cuenta con sistemas antioxidantes que permiten mantener un control sobre estas especies para evitar el daño oxidante.

Se puede definir como antioxidante a cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones con respecto al sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de este sustrato (Diplock et al., 1998).

Una forma de clasificar los antioxidantes es: enzimáticos y no enzimáticos. Entre los primeros existen varias enzimas que catalíticamente remueven las EROs, entre ellas se encuentran las siguientes:

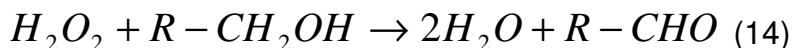
**Superóxido dismutasa (SOD).** Cataliza la conversión del  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  (reacción 12). Es una enzima que se encuentra en el citoplasma (CuZnSOD), mitocondria (MnSOD) y en el fluido extracelular (CuZnSOD) (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).



**Catalasa.** Cataliza la reducción del  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (reacción 13). Esta enzima se encuentra en todas las células aeróbicas principalmente en peroxisomas y mitocondrias.

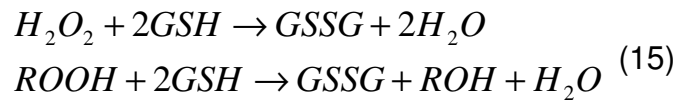


También tiene actividad de peroxidasa (reacción 14).



Se encuentra en mayor proporción en hígado y en eritrocitos, ya que aquí se llevan a cabo procesos metabólicos en los que se producen grandes cantidades de  $H_2O_2$  (Olinescu y Smith, 2002).

**Glutación peroxidasa (GPx).** Cataliza la reducción de peróxidos orgánicos empleando dos moléculas de glutación reducido (GSH). Los productos de la reacción son glutación oxidado (GSSG) y H<sub>2</sub>O (reacción 15). Es una selenoenzima presente en varias isoformas, entre las que se encuentran la GP<sub>x</sub> citosólica, la GPx plasmática y la GPx de fosfolípidos (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).



La existencia de antioxidantes no enzimáticos, incrementa la capacidad del organismo para defenderse de las EROs. Algunos de ellos son:

**Glutación.** Es un tripéptido formado por ácido glutámico, glicina y cisteína, es uno de los principales antioxidantes de la célula. En su forma reducida, glutación (GSH) participa en múltiples reacciones y procesos. También se le conoce como tiol por su grupo funcional el cual le confiere la capacidad de donar electrones. A diferencia de algunas enzimas, el GSH tiene un grupo sulfhidrilo expuesto fácilmente atacado que por las EROs (Olinescu y Smith, 2002).

**Vitamina C.** Se localiza en el citosol y en fluidos extracelulares (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). Este compuesto interactúa directamente con las EROs, además restaura las propiedades antioxidantes de la vitamina E y del GSSG. Representa la protección más efectiva contra la lipoperoxidación en plasma. Es efectiva para atrapar especies como el O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y OH<sup>•</sup> (Olinescu y Smith, 2002).

**Vitamina E.** Es el principal antioxidante liposoluble y su principal función es mantener la integridad de la membrana celular (Olinescu y Smith, 2002).

Esta vitamina está compuesta de varios tocoferoles, de los cuales, el α-tocoferol es el que presenta mayor capacidad atrapadora (Eberhardt, 2001). Tiene la capacidad de interrumpir la lipoperoxidación en la fase de propagación (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

Estudios epidemiológicos indican que la ingesta de frutas y verduras se asocia con una menor incidencia de enfermedades crónicas como cáncer, enfermedad de Alzheimer, enfermedad del Parkinson, enfermedades cardiovasculares, entre otras, lo cual se atribuye a

la combinación óptima de fitoquímicos como antioxidantes naturales y compuestos bioactivos presentes en estos productos (Nicoli et al., 1999; Aruoma, 2003; Velioglu et al., 1998; Jung et al., 2006).

#### **1.4.5. Estrés oxidante.**

Es la situación en la que se pierde el balance entre condiciones oxidantes y defensas antioxidantes, puede ser resultado de la (a) disminución de los niveles de antioxidantes o de reparación por ejemplo las mutaciones afectan la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, glutatión peroxidasa) o toxinas que agotan las defensas antioxidantes y/o (b) incremento de la producción de EROs por ejemplo ante la exposición de niveles elevados de O<sub>2</sub>, toxinas que por sí solas son especies reactivas (por ejemplo NO<sub>2</sub><sup>•</sup>), también por activación excesiva de los sistemas de producción de estas especies (células fagocíticas) en enfermedades crónicas (Halliwell y Whiteman, 2004).

Bajo estas condiciones se presentan daños de las macromoléculas por el rompimiento o modificación de su estructura, trayendo como consecuencia una alteración en la función o incluso muerte celular (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La toxicidad del oxígeno se debe a la producción excesiva de las EROs que causan daño a los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas promoviendo así el desarrollo de enfermedades degenerativas mediadas a través de estrés oxidante. Una alternativa para aumentar la capacidad del organismo para defenderse de esta condición es la ingesta de antioxidantes exógenos. Dado que la  $\alpha$ -mangostina es la principal xantona del mangostán y presenta entre otras actividades biológicas, capacidad antioxidante, es necesario realizar estudios para caracterizar con detalle esta capacidad específica contra las EROs:  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $^1\text{O}_2$ , y  $\text{ONOO}^-$ .



### 3. OBJETIVOS

#### **3.1 Objetivo general**

Evaluar la capacidad antioxidante específica de la  $\alpha$ -mangostina ante las EROs:  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $^1\text{O}_2$ , y  $\text{ONOO}^-$ .

#### **3.2 Objetivo particular:**

Determinar y comparar el valor de  $\text{CI}_{50}$  de la  $\alpha$ -mangostina con los  $\text{CI}_{50}$  de los antioxidantes de referencia.

#### 4. MATERIALES.

La  $\alpha$ -mangostina que se usó en este trabajo fue aislada en un trabajo previo para tesis de Licenciatura (González-Cuahutencos, 2007).

Los reactivos fueron adquiridos de las siguientes compañías:

Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA): N, N-Dimetil-4-nitrosoanilina (DMNA), sulfato amoniacal de hierro (II) hexahidratado, L-Ácido ascórbico, hidroxitolueno butilado (BHT), catalasa de hígado de bovino, L-histidina, dióxido de manganeso ( $MnO_2$ ), glutatión forma reducida (GSH), sal sódica de naranja de xilenol, DL-Penicilamina, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), dimetil sulfóxido (DMSO), nitrito de potasio ( $KNO_2$ ), azul de nitrotetrazolio (NBT) y xantina oxidasa.

J. T Baker (México, D.F.): Hidróxido de sodio (NaOH), fosfato de sodio dibásico anhidro ( $Na_2HPO_4$ ), fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ), hipoclorito de sodio (NaOCl) solución al 5% de cloro disponible y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en solución al 30%.

Mallinckrodt (París, KY, USA): Carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ).

Cayman Chemical (Ann Arbor, Mi, USA): Dihidrorodamina (DHR) 123.

Todos los reactivos fueron grado analítico.

Para realizar las mediciones espectrofotométricas se usó un espectrofotómetro Beckman Coulter, modelo DU<sup>®</sup>640 y para realizar las mediciones de fluorescencia se usó un espectrofluorómetro Biotek Synergy HT.

## 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1 Determinación de la capacidad atrapadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*.

FUNDAMENTO: El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en el medio de reacción oxida al ión ferroso (Fe<sup>2+</sup>) a su forma férrica (Fe<sup>3+</sup>) el cual se une a la sal sódica de naranja de xilenol y forma un complejo colorido que absorbe a una longitud de onda de 560 nm (Figura 6).

Si la muestra presenta un efecto atrapador ante el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entonces el Fe<sup>2+</sup> no se oxidará y por lo tanto no habrá Fe<sup>3+</sup> que pueda reaccionar con la sal sódica de naranja de xilenol y la formación del complejo colorido disminuirá respecto al control.

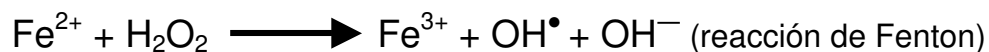


Figura 6. Capacidad atrapadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### Metodología

En un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezcló una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 75 µM (1:1 v/v) con agua destilada (tubo control: 0% atrapamiento) o con diferentes concentraciones de α-mangostina (de 0–2.5 mM) el volumen final de la mezcla fue 100 µl y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Se añadieron 0.9 ml del reactivo de FOX; se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente y se midió absorbancia a 560 nm (Floriano-Sánchez et al., 2006; Medina-Campos et al., 2007).

Para preparar el reactivo de FOX se mezclan 9 volúmenes de hidroxitolueno butilado 4.4 mM en metanol grado HPLC con 1 volumen de una solución de naranja de xilenol 2.56 mM y sulfato ferroso amoniacal en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25 M.

Se utilizó piruvato de sodio (0-10.2 mM) como compuesto atrapador de referencia ante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

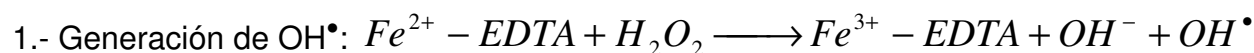
Para determinar la capacidad atrapadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se considera que el valor de absorbancia obtenido en el tubo control es debido al 100% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente ya que no tiene el compuesto antioxidante que lo degrade y los valores obtenidos con la muestra se comparan con respecto a este tubo control.

$$\text{Capacidad atrapadora de H}_2\text{O}_2 (\%) = \left[ 1 - \left( \frac{\text{abs}_{\text{muestra}}}{\text{abs}_{\text{control}}} \right) x \right] 100$$

## 5.2 Determinación de la capacidad atrapadora de OH• *in vitro*.

FUNDAMENTO: Los OH• generados por la reacción del complejo hierro/EDTA con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de ácido ascórbico, descomponen a la desoxirribosa formando una mezcla compleja de productos que con calentamiento a pH ácido, forman el malondialdehído y es detectado por su capacidad de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA); formando así un cromógeno que absorbe a una longitud de onda de 532 nm (Figura 7).

Al adicionar atrapadores de OH• compiten con la desoxirribosa por los radicales producidos y por lo tanto la formación del cromógeno disminuye (Halliwell et al., 1987; Aruoma, 1994a).



2.- Degradación de 2-desoxirribosa por OH•

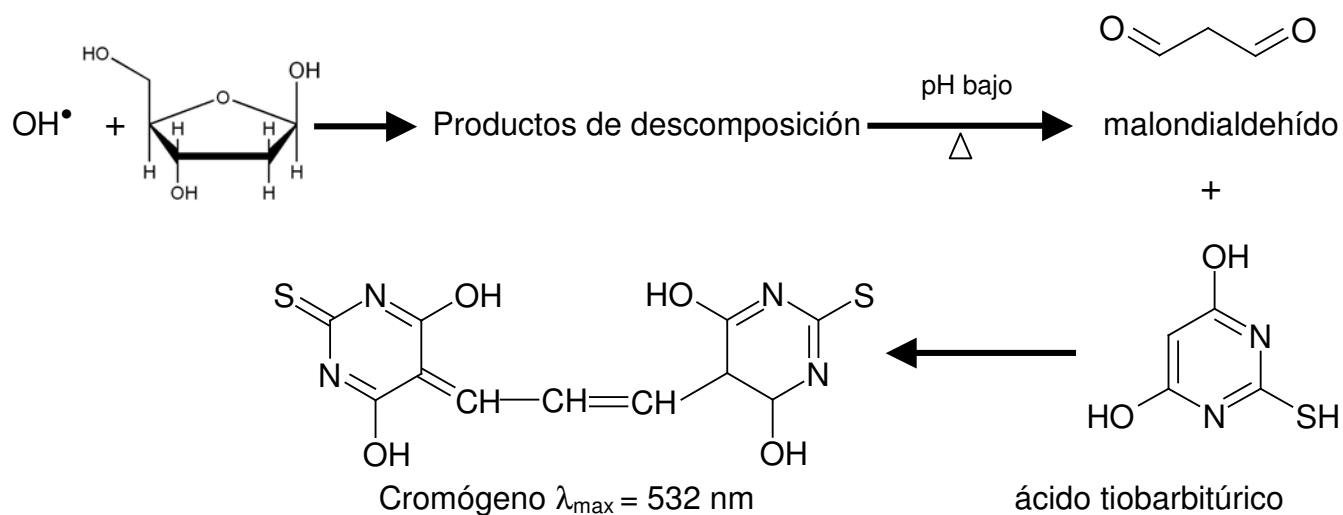


Figura 7. Capacidad atrapadora de OH• por el método de la desoxirribosa.

### Metodología

Para la mezcla de reacción se utilizó ácido ascórbico 0.2 mM, desoxirribosa 0.56 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM, amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4, α-mangostina en diferentes concentraciones (0-4.8 μM) o amortiguador de fosfatos 15 mM pH 7.4 (tubo control: 0% atrapamiento). La reacción inicia con la adición de EDTA 0.208 mM/ FeCl<sub>3</sub> 0.2 mM; el volumen hasta este punto fue de 1 mL. Se incubó a 37°C por 1 h. Después se añadió 1 mL de la solución TBA (26 mM)/HCl (2.08%)/ácido tricloroacético (15%)/Deferoxamine mesylate (0.33 mM) y esta

mezcla se calentó a 100°C durante 10 min (en un baño con aceite). Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió absorbancia a 532 nm.

Se utilizó manitol (0-20 mM) como compuesto atrapador de OH•.

Para calcular la capacidad atrapadora de OH• se consideró al valor de absorbancia obtenido en el tubo control como máxima formación de cromógeno debido a la presencia del 100% de OH• formado y los valores obtenidos con las muestras se comparan con respecto a este control.

$$\text{Capacidad atrapadora de OH}^\bullet (\%) = \left[ 1 - \left( \frac{\text{abs}_{\text{muestra}}}{\text{abs}_{\text{control}}} \right) \right] \times 100$$

### 5.3 Determinación de la capacidad atrapadora de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> *in vitro*.

FUNDAMENTO: La xantina oxidasa cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico, generándose además O<sub>2</sub><sup>•-</sup> el cual reduce al NBT (las sales de tetrazolio son indicadores coloridos muy sensibles a reacciones enzimáticas redox) y se forma entonces un producto insoluble colorido (formazán) que absorbe a una longitud de onda de 560 nm (Figura 8).

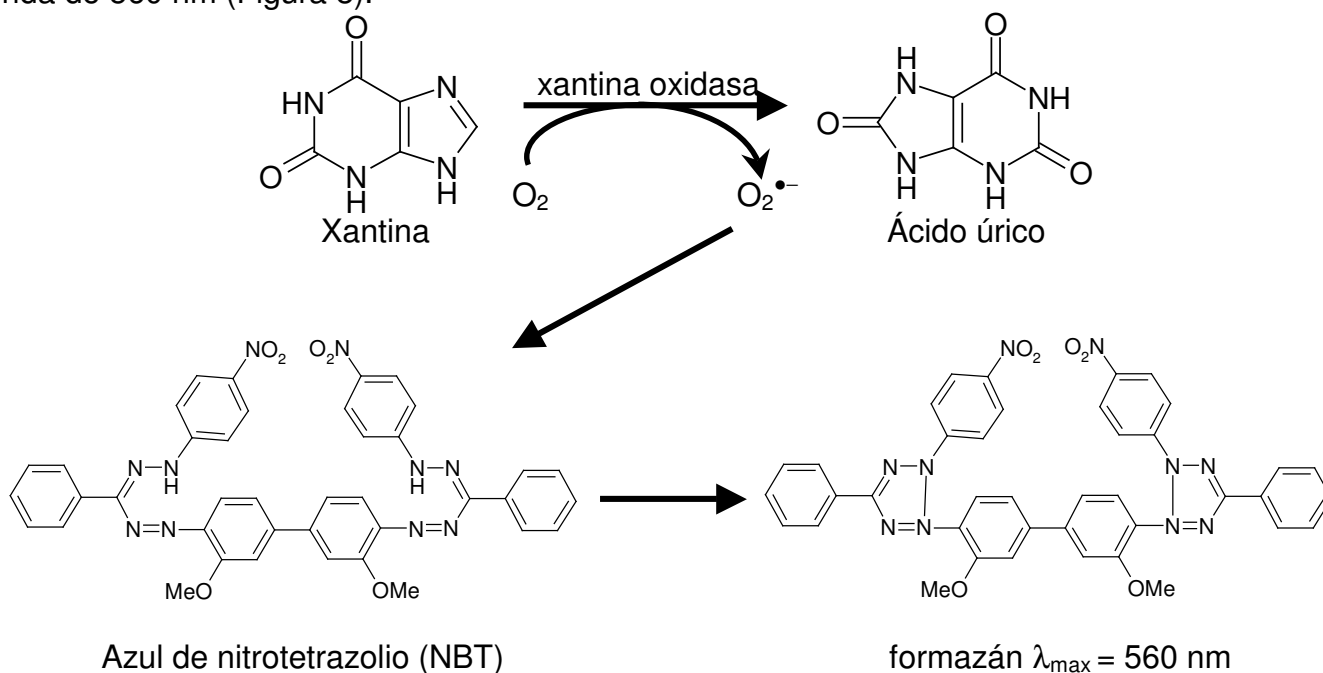


Figura 8. Determinación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> por la actividad de la xantina oxidasa.

Sin embargo es importante considerar que el compuesto a analizar no afecte la actividad de

la xantina oxidasa, lo que en consecuencia evitaría la generación del  $O_2^{\bullet-}$  y la reducción del NBT. Para ello es necesario medir la generación de ácido úrico a una longitud de onda de 295 nm (Pedraza-Chaverri et al., 2004; Floriano-Sánchez et al., 2006). Bajo esta perspectiva, un compuesto que atrapa  $O_2^{\bullet-}$  disminuye la reducción del NBT (y la producción de formazán), sin interferir con la actividad de la xantina oxidasa, es decir con la generación de ácido úrico y de  $O_2^{\bullet-}$  (Medina-Campos et al., 2007).

### Metodología

El sustrato (400  $\mu$ L) de la reacción fue preparado con xantina 23  $\mu$ M, carbonato de sodio 20  $\mu$ M, NBT 29  $\mu$ M, amortiguador de fosfatos 18 mM pH 7.0 y se mezcló con 50  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos 6 mM pH 7.0 (tubo control: 0% atrapamiento) o con 50  $\mu$ L de diferentes concentraciones de  $\alpha$ -mangostina (de 0-100  $\mu$ M). La reacción se inició con la adición de 50  $\mu$ L de una solución (168 U/L) de xantina oxidasa. Se siguió el desarrollo de la reacción mediante la medición de absorbancia a 295 nm (para la formación de ácido úrico) y a 560 nm (para la formación de formazán) cada minuto durante 3 minutos y estableciendo como referencia (tubo control) para cada ensayo que la diferencia de absorbancia/minuto a 560 nm fuera de 0.05.

Se utilizó el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) (de 0-27  $\mu$ M) como atrapador de  $O_2^{\bullet-}$ .

Para determinar la capacidad atrapadora de  $O_2^{\bullet-}$  se calcularon los deltas de absorbancia a 560 nm del tubo control que corresponde a la máxima formación de formazán debido a la presencia del 100% de  $O_2^{\bullet-}$  generado y los datos obtenidos con las muestras se comparan con las deltas de absorbancia de dicho control.

$$\text{Capacidad atrapadora de } O_2^{\bullet-} (\%) = \left[ 1 - \left( \frac{\Delta abs_{muestra}}{\Delta abs_{control}} \right)^x \right] 100$$

en donde  $\Delta abs$  = absorbancia/minuto

### 5.4 Determinación de la capacidad atrapadora de $^1O_2$ *in vitro*.

FUNDAMENTO: El  $^1O_2$  generado a partir de NaOCl y  $H_2O_2$ , produce la disminución de absorbancia (decoloración) del compuesto N,N-dimetil-p-nitrosoanilina (DMNA) es cual es utilizado como atrapador selectivo de  $^1O_2$  (Pedraza-Chaverri et al., 2004; Floriano-Sánchez et

al., 2006; Medina-Campos et al., 2007). La reacción entre la DMNA y el  $^1O_2$  se permite durante 40 min a temperatura ambiente (Figura 9).

Si el compuesto a analizar tiene una capacidad atrapadora ante  $^1O_2$  entonces la DMNA no se decolorará.

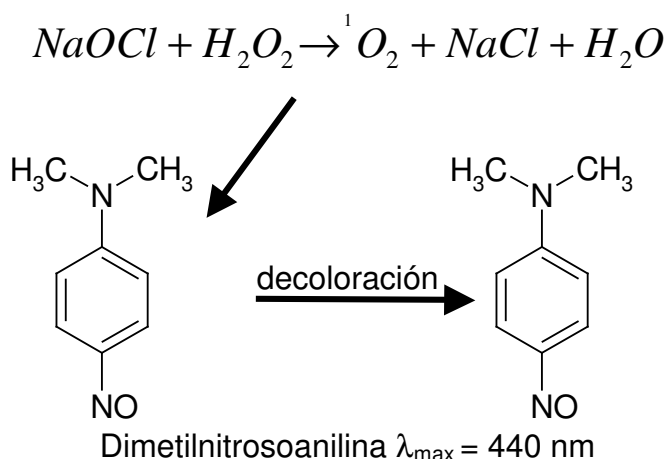


Figura 9. Capacidad atrapadora de  $^1O_2$  a través de la decoloración de DMNA.

#### Metodología

La mezcla de reacción se preparó con amortiguador de fosfatos 45 mM pH 7.1, histidina 10 mM,  $H_2O_2$  10 mM, NaOCl 10 mM, amortiguador de fosfatos 3 mM pH 7.1 (tubo control: 0% atrapamiento) o diferentes concentraciones de  $\alpha$ -mangostina (de 0-25  $\mu\text{M}$ ); al adicionar la N,N-dimetil-p-nitrosoanilina 1 mM se mide absorbancia a 440 nm ( $t_0$ ). Se deja incubar a temperatura ambiente durante 40 min y se mide absorbancia a 440 nm ( $t_{40}$ ).

Para determinar la capacidad atrapadora de  $^1O_2$  se considera la diferencia de absorbancia (absorbancia al tiempo  $t_0$  – absorbancia al tiempo  $t_{40}$ ) del tubo control\* como el máximo decoloramiento del DMNA debido a la presencia del 100% de  $^1O_2$  generado y las diferencias de absorbancia ( $t_0$ - $t_{40}$ ) obtenidas con las muestras se comparan con las del tubo control.

\*Para cada ensayo se estableció que la diferencia de  $t_0$ - $t_{40}$  a 440nm del tubo control fuera de 1.0.

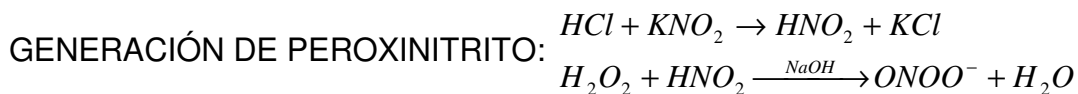
$$\text{Capacidad atrapadora de } ^1O_2 (\%) = \left[ 1 - \left( \frac{\Delta abs_{muestra}}{\Delta abs_{control}} \right) \right] \times 100$$

en donde  $\Delta abs = abs t_0 - abs t_{40}$

### 5.5 Determinación de la capacidad atrapadora de $\text{ONOO}^-$ *in vitro*.

FUNDAMENTO: El  $\text{ONOO}^-$  provoca la oxidación de la dihidrorodamina 123 produciendo la rodamina 123 que es un compuesto fluorescente y tiene una  $\lambda_{\text{excitación}} = 505 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{emisión}} = 529 \text{ nm}$  (Kooy et al., 1994; Medina-Campos et al., 2007; Floriano-Sánchez et al., 2006) (Figura 10).

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



DETECCIÓN:

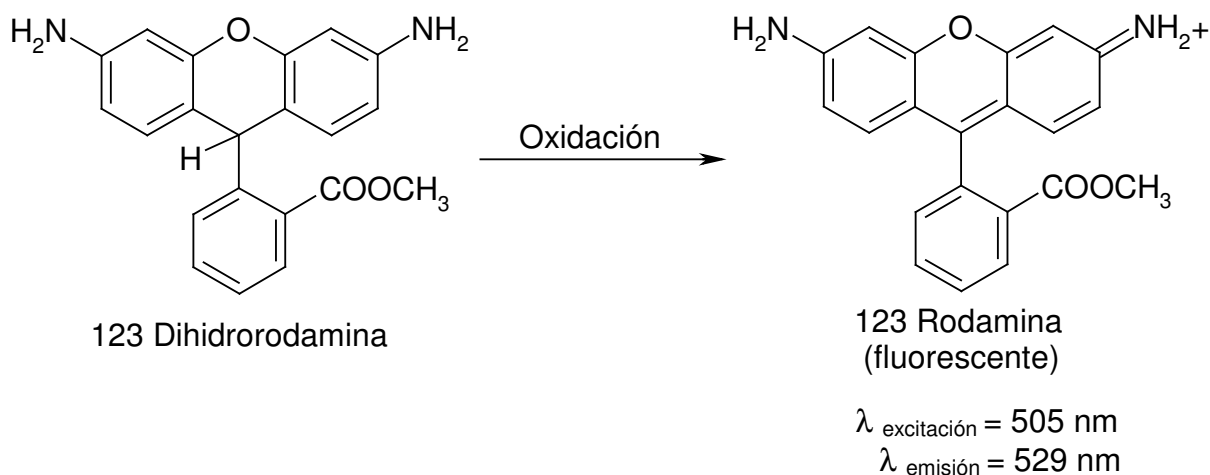


Figura 10. Capacidad atrapadora de  $\text{ONOO}^-$  a través de la oxidación de DHR 123

#### Metodología

Para hacer este ensayo fue necesario sintetizar el  $\text{ONOO}^-$  de la siguiente manera: En un baño de hielo se realiza permitiendo durante 1 segundo la reacción entre 5 mL de una solución ácida de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.7 M (en HCl 0.6 M) con 5 mL de  $\text{KNO}_2$  0.6 M. La reacción se detiene añadiendo 5 mL de NaOH 1.2 M frío. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  residual de la mezcla se remueve pasando la solución a través de una columna de  $\text{MnO}_2$  previamente lavada con NaOH 1.2 M (Medina-Campos et al., 2007). La solución de  $\text{ONOO}^-$  se guarda en tubos eppendorf de 1.5 mL en alícuotas de 0.5 mL protegida de la luz a  $-80^\circ\text{C}$ , hasta su uso.

La concentración de  $\text{ONOO}^-$  se determinó espectrofotométricamente a 302 nm antes de realizar cada ensayo usando el coeficiente de extinción molar de  $1,670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Medina-Campos et al., 2007).



Para medir la capacidad atrapadora de  $\text{ONOO}^-$  se utilizó la siguiente mezcla de reacción 165  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfatos 75 mM pH 7.4, 25  $\mu\text{L}$  de DTPA 100 mM, 25  $\mu\text{L}$  amortiguador de fosfatos 75 mM pH 7.4 (tubo control: 0% atrapamiento) ó  $\alpha$ -mangostina en diferentes concentraciones (de 0-450  $\mu\text{M}$ ), 35  $\mu\text{L}$  de dihidrorodamina-123 50  $\mu\text{M}$  (preparada a partir de una solución concentrada de DHR-123 28 mM en DMSO). La reacción comenzó con la adición de 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{ONOO}^-$  1.25 mM. Estos dos últimos reactivos se mantuvieron en hielo y protegidos de la luz hasta antes de adicionarlos a la mezcla de reacción. Se midió fluorescencia (UF) usando  $\lambda_{\text{excitación}}$  de 485/20 nm y una  $\lambda_{\text{emisión}}$  de 528/20 nm con una sensibilidad de 35, en un espectrofluorómetro Biotek Synergy HT.

Para calcular la capacidad atrapadora de  $\text{ONOO}^-$  se consideró la fluorescencia del tubo control\* como la máxima cantidad de rodamina 123 formada por la acción del 100% de  $\text{ONOO}^-$  generado sobre la dihidrorodamina 123. Si la muestra presenta capacidad atrapadora, habrá una disminución parcial o total de la rodamina 123 formada.

$$\text{Capacidad atrapadora de } \text{ONOO}^- (\%) = \left[ 1 - \left( \frac{UF_{\text{muestra}}}{UF_{\text{control}}} \right) \right] \times 100$$

\*En todos los ensayos se utilizó un control espectrofotométrico en la mezcla de reacción en ausencia de  $\text{ONOO}^-$ , es decir la absorbancia a 500 nm fue de 0.3.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos están expresados como promedio  $\pm$  error estándar (EE). Los datos se compararon contra el tubo sin  $\alpha$ -mangostina o compuesto de referencia usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett.

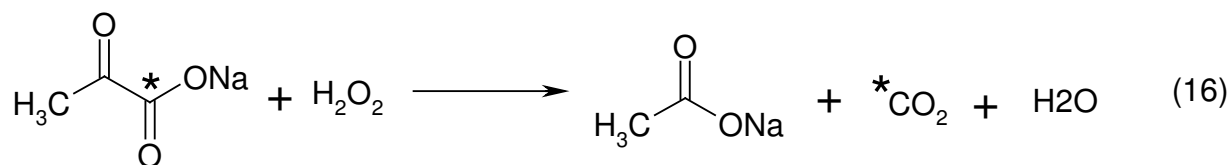
La capacidad antioxidante se expresó como  $CI_{50}$  que es el valor de la concentración de  $\alpha$ -mangostina o del compuesto de referencia ( $\mu$ M o mM) que es capaz de atrapar o inhibir el 50% de la ERO presente o generada en cada ensayo. Mientras más pequeño sea el valor de  $CI_{50}$  más eficaz será la capacidad de antioxidante del compuesto (Floriano-Sánchez et al., 2006; Medina-Campos et al., 2007). Para analizar y graficar los datos se utilizó el software Graphpad Prism versión 3.0.

### Pruebas de solubilidad.

Debido a que la  $\alpha$ -mangostina es insoluble en agua se realizaron pruebas de solubilidad en diferentes disolventes acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol y metanol para determinar la máxima concentración de  $\alpha$ -mangostina que se podría analizar en los ensayos antioxidantes, así mismo se analizó si el disolvente interfería en el ensayo.

### 6.1 Determinación de la capacidad atrapadora de $H_2O_2$ .

En este ensayo se utilizó como compuesto de referencia al piruvato que reacciona con el  $H_2O_2$  actuando así como atrapador de esta especie (reacción 16) (Halliwell y Gutteridge, 2001).



En la Figura 11 se muestra que el piruvato atrapa  $H_2O_2$  en forma dependiente de la concentración. La capacidad atrapadora fue significativa a 0.67-10.18 mM de piruvato. El valor calculado de  $CI_{50}$  es  $1.18 \pm 0.1$  mM, lo cual nos indica la concentración necesaria para atrapar el 50% del  $H_2O_2$  presente.

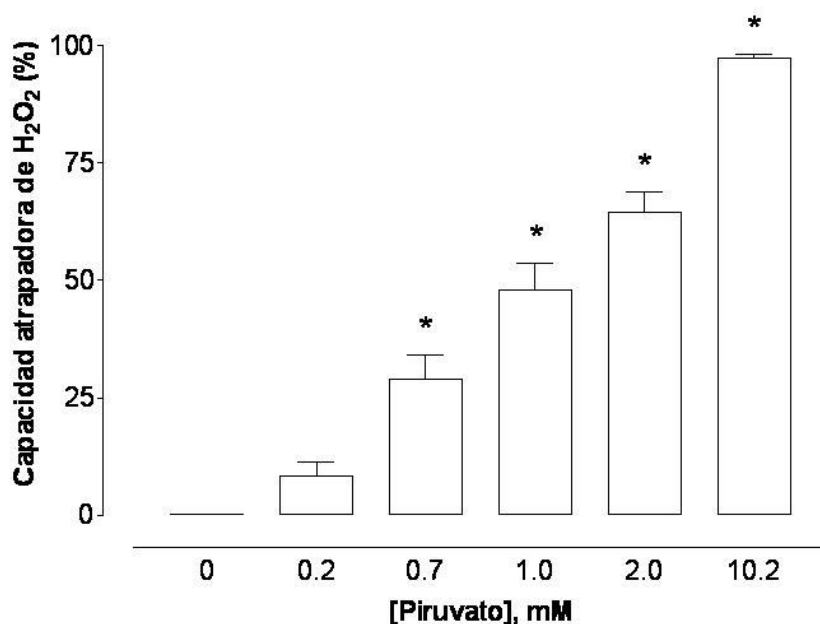


Figura 11. Capacidad atrapadora del piruvato sobre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos están expresados como promedio±EE (n=9) \*p<0.001 vs 0 mM.

Para analizar  $\alpha$ -mangostina, fue necesario averiguar los disolventes que se podían utilizar en este ensayo, por lo que se determinó la solubilidad de acuerdo al volumen y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requeridos en el ensayo (Tabla 2).

Tabla 2. Solubilidad de  $\alpha$ -mangostina con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

[ $\alpha$ -mangostina] (mg/mL)	[ $\alpha$ -mangostina] (mM)	Solubilidad con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Disolvente
2.6	6.3	Sí	etanol
0.5	1.2	Sí	metanol
0.5	1.2	Sí	acetona

Para este ensayo se preparó una solución concentrada de  $\alpha$ -mangostina en etanol puro ya que como se indica en la tabla anterior, dicho disolvente permitía analizar una mayor concentración del compuesto sin que precipitara con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a partir de la solución concentrada se realizaron diluciones en agua, de tal manera que el etanol también se diluyó; las concentraciones que finalmente se analizaron se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones analizadas de  $\alpha$ -mangostina y etanol.

n=6	Intervalo de concentraciones
$\alpha$ -mangostina en etanol	0.5 $\mu$ M – 2.5 mM
etanol	2.2 $\mu$ M –2.1 M

La  $\alpha$ -mangostina no presentó capacidad atrapadora de  $H_2O_2$ , en las concentraciones analizadas, con 30 minutos de incubación. Al mismo tiempo se analizó una serie que contenía las diferentes concentraciones de etanol en las que se disolvió  $\alpha$ -mangostina y se determinó que este disolvente tampoco presentaba capacidad atrapadora de  $H_2O_2$ .

### 6.2 Determinación de la capacidad atrapadora de $OH^\bullet$ .

Se utilizó manitol como atrapador de  $OH^\bullet$ . En la Figura 12 se muestra que el manitol atrapa  $OH^\bullet$  en forma dependiente de la concentración. La capacidad atrapadora fue significativa a 0.5-20 mM de manitol. El valor calculado de  $CI_{50}$  es  $2.9 \pm 0.2$  mM.

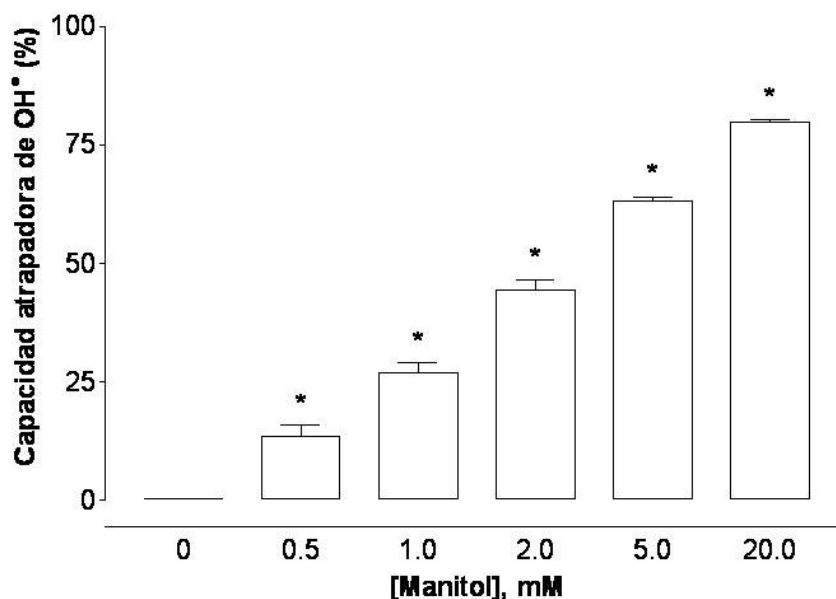


Figura 12. Capacidad atrapadora del manitol sobre  $OH^\bullet$ . Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE (n=5) \*p<0.001 vs 0 mM.

Para realizar este ensayo se preparó una solución concentrada de  $\alpha$ -mangostina en etanol puro y a partir de ésta se realizaron diluciones por lo que el etanol también se diluyó. Se

analizó una serie que contenía únicamente etanol en las diferentes concentraciones de en que se disolvió  $\alpha$ -mangostina (Figura 13, barras blancas) y otra serie que contenía  $\alpha$ -mangostina disuelta en etanol (Figura 13, barras negras). Las concentraciones analizadas se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones analizadas de  $\alpha$ -mangostina y etanol.

n=7	Intervalo de Concentraciones
etanol	0.1 - 8.6 mM
$\alpha$ -mangostina en etanol	0.01- 0.97 $\mu$ M

En la Figura 27 se muestra que ambas series atrapan  $\text{OH}^\bullet$  en forma dependiente de la concentración, sin embargo, dado que el porcentaje de atrapamiento en cada una de las concentraciones analizadas es el mismo y que ambas series tienen la misma concentración de etanol, se concluye que el efecto atrapador mostrado por la serie correspondiente a la  $\alpha$ -mangostina es causado por la presencia de etanol.

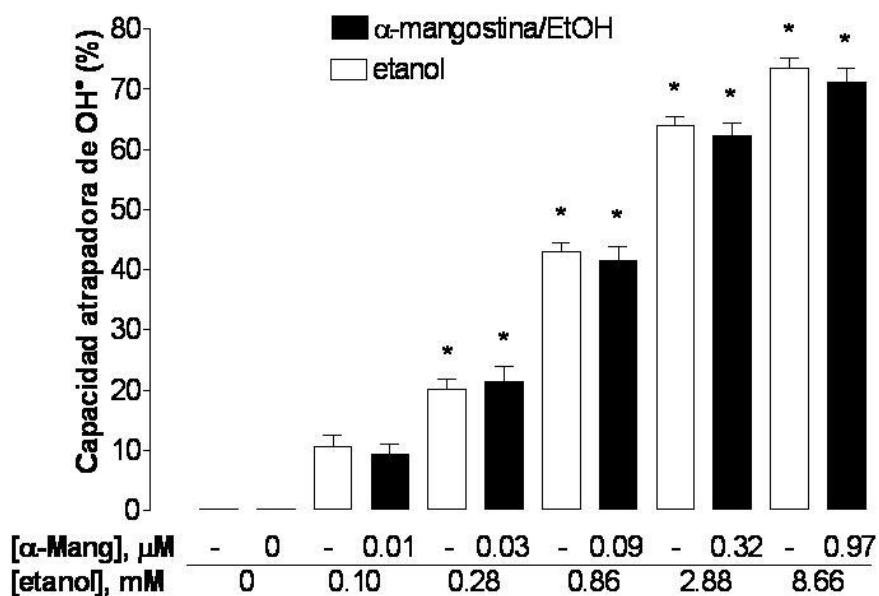


Figura 13. Capacidad atrapadora de Etanol y  $\alpha$ -mangostina/Etanol sobre  $\text{OH}^\bullet$ . Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE (n=7) \*p<0.001 vs 0 mM.

Se analizó hasta una concentración de  $\alpha$ -mangostina 4.8  $\mu$ M en etanol 43.3 mM sin embargo, aunque esta concentración de  $\alpha$ -mangostina es aproximadamente 5 veces mayor, únicamente se alcanza un porcentaje de atrapamiento de 80%.

Se calculó la capacidad antioxidante de las dos series, respecto a la concentración de etanol, para hacer la comparación estadística. El valor calculado de  $CI_{50}$  es  $1.6 \pm 0.1$  mM para la serie que sólo contenía etanol y  $CI_{50} = 1.7 \pm 0.3$  mM para la serie que contenía  $\alpha$ -mangostina disuelta en etanol. En la Figura 14 se comparan los valores de  $CI_{50}$  y se puede observar que no hay diferencia significativa por lo se concluye que el efecto observado es debido únicamente al disolvente (etanol) y que en las concentraciones analizadas, la  $\alpha$ -mangostina no atrapa  $OH^\bullet$ .

También se realizaron pruebas utilizando como disolvente acetona, metanol y dimetilsulfóxido y en todas se obtuvo el mismo efecto que el etanol.

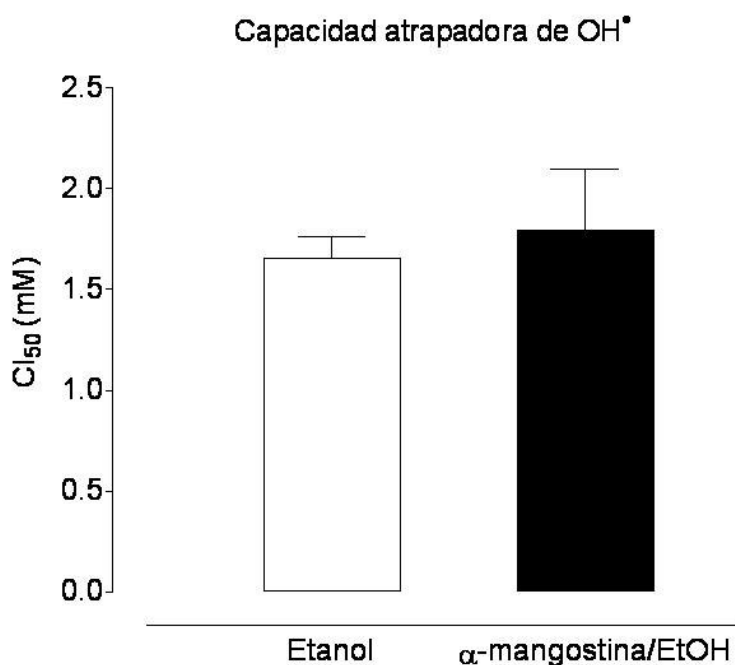


Figura 14. Capacidad atrapadora de  $\alpha$ -mangostina/Etanol y Etanol sobre  $OH^\bullet$ . Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE (n=7).

La reacción con  $OH^\bullet$  se puede clasificar principalmente de tres tipos: abstracción de hidrógeno, adición del radical a una molécula y transferencia de electrón. La reacción  $OH^\bullet$  con el manitol y etanol es un ejemplo de abstracción de hidrógeno. En donde el  $OH^\bullet$  le quita un átomo de hidrógeno a la molécula para formar agua, dejando un electrón desapareado en

un átomo de carbono, posteriormente este radical puede participar en más reacciones o unirse con otro radical mediante un enlace covalente.

Como se sabe la reacción de un radical con una molécula produce un nuevo radical, el cual puede ser más, menos o igual de reactivo que el radical original, dando así inicio a reacciones en cadena. Los radicales producidos por reacciones con  $\text{OH}^\bullet$  son usualmente menos reactivos (Halliwell y Gutteridge, 2001).

### 6.3 Determinación de la capacidad atrapadora de $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

En este ensayo se utilizó como compuesto de referencia al NDGA, que es un polifenol obtenido del arbusto *Larrea tridentata*. Es un atrapador eficaz de  $\text{ONOO}^-$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{HOCl}$  (Floriano-Sánchez et al., 2006). En la Figura 15 se muestra que el NDGA atrapa  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en forma dependiente de la concentración. La capacidad atrapadora fue significativa 4.63-26.98  $\mu\text{M}$  de NDGA.

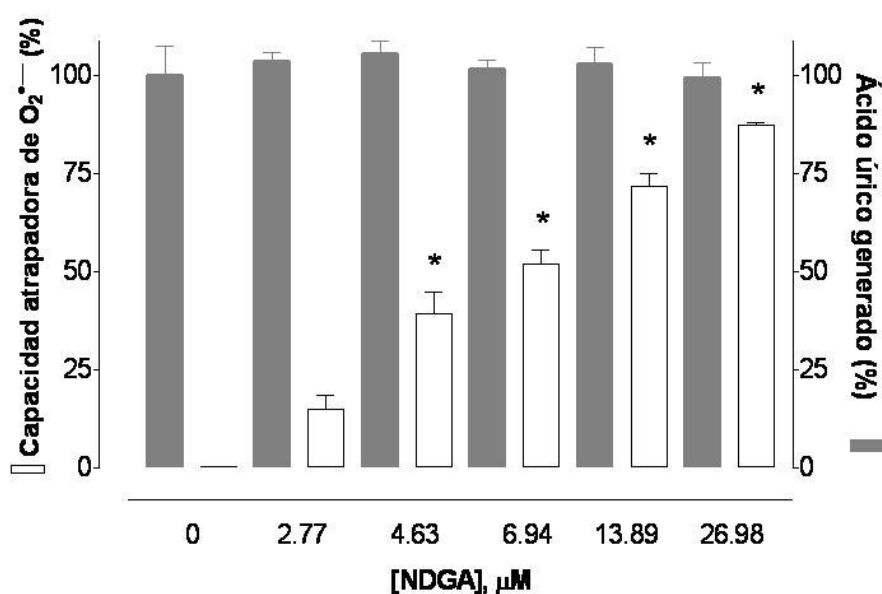


Figura 15. Capacidad atrapadora del NDGA sobre  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE (n=6) \*p<0.001 vs 0 mM.

El valor calculado de  $\text{CI}_{50}$  es  $6.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$ . El NDGA no afecta la actividad de la xantina oxidasa ya que también se puede observar en la Figura 29 que la generación de ácido úrico, y por tanto de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , permanece constante usando diferentes concentraciones de NDGA.

Es necesario aclarar que el NDGA se disolvió en DMSO 0.63-12.73 mM y se demostró que en estas concentraciones este disolvente no atrapa  $O_2^{\bullet-}$  y que no afecta la actividad de la xantina oxidasa.

Para realizar este ensayo se preparó una solución concentrada de  $\alpha$ -mangostina en DMSO puro y a partir de ésta se realizaron diluciones por lo que el DMSO también se diluyó; el intervalo de concentraciones que se utilizó de este disolvente fue 8.7-127.3 mM y se demostró que en estas concentraciones no atrapa  $O_2^{\bullet-}$  y que no afecta la actividad de la xantina oxidasa.

En la Figura 16 se muestra que  $\alpha$ -mangostina atrapa  $O_2^{\bullet-}$  en forma dependiente de la concentración. La capacidad atrapadora fue significativa a 20.4-100  $\mu$ M de  $\alpha$ -mangostina.

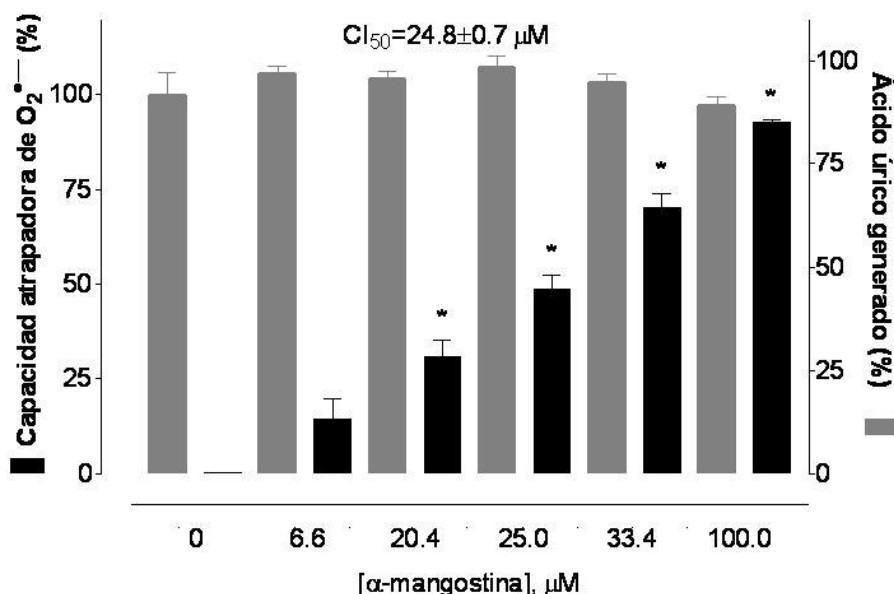


Figura 16. Capacidad atrapadora de  $\alpha$ -mangostina sobre  $O_2^{\bullet-}$ . Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE (n=6) \*p<0.001 vs 0 mM.

El valor calculado de  $CI_{50}$  es  $24.8 \pm 0.7 \mu$ M. Se observa que  $\alpha$ -mangostina no afecta la actividad de la xantina oxidasa (Figura 16) puesto que la generación de ácido úrico permanece constante en las diferentes concentraciones de  $\alpha$ -mangostina analizadas, indicando que así también la producción de  $O_2^{\bullet-}$  permanece constante.



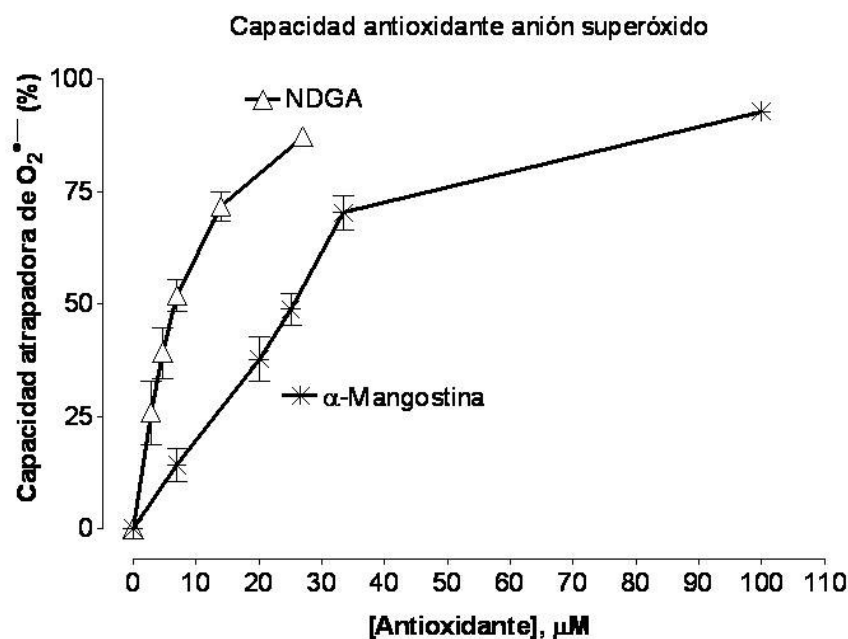


Figura 17. Capacidad antioxidante de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Los datos están expresados como promedio $\pm$ EE.

En la Figura 17 se presenta la comparación estadística de la capacidad antioxidante del NDGA y de  $\alpha$ -mangostina, se observa que hay diferencia significativa entre éstas ya que se requiere menor concentración de NDGA para atrapar el 50% de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  generado por lo que su actividad antioxidante es mayor.

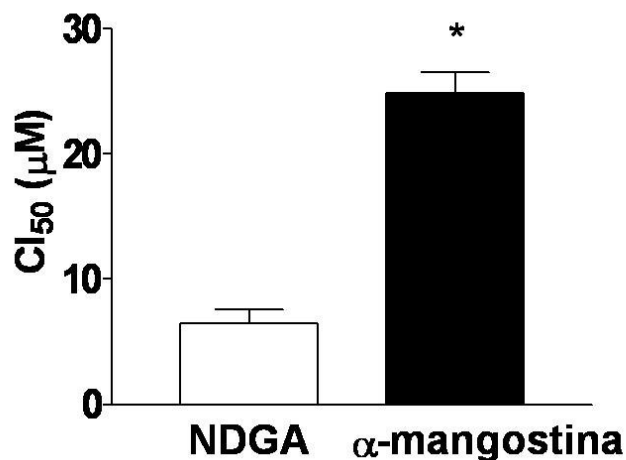


Figura 18. Comparación estadística de los valores  $\text{CI}_{50}$  de NDGA y  $\alpha$ -mangostina. Los datos están expresados como promedio $\pm$ EE, \* $p < 0.001$ .

En la Figura 18 se muestra la comparación estadística de los valores de  $\text{CI}_{50}$  de  $\alpha$ -

mangostina y del NDGA. El NDGA fue 3.8 veces más efectivo que  $\alpha$ -mangostina para atrapar  $O_2^{\bullet-}$ .

#### 6.4 Determinación de la capacidad atrapadora de $^1O_2$ .

En este ensayo se utilizó al glutatión como compuesto de referencia, el cual es uno de los principales antioxidantes de la célula y que posee un grupo sulfhidrilo expuesto fácilmente atacado por las EROs. Es un atrapador de  $^1O_2$  y  $O_2^{\bullet-}$  (Floriano-Sánchez et al., 2006).

En la Figura 19 se muestra que el GSH atrapa  $^1O_2$  de forma dependiente de la concentración. La capacidad atrapadora fue significativa a 2.5-10 mM de GSH. El valor calculado de  $CI_{50}$  es  $2.9 \pm 0.1$  mM.

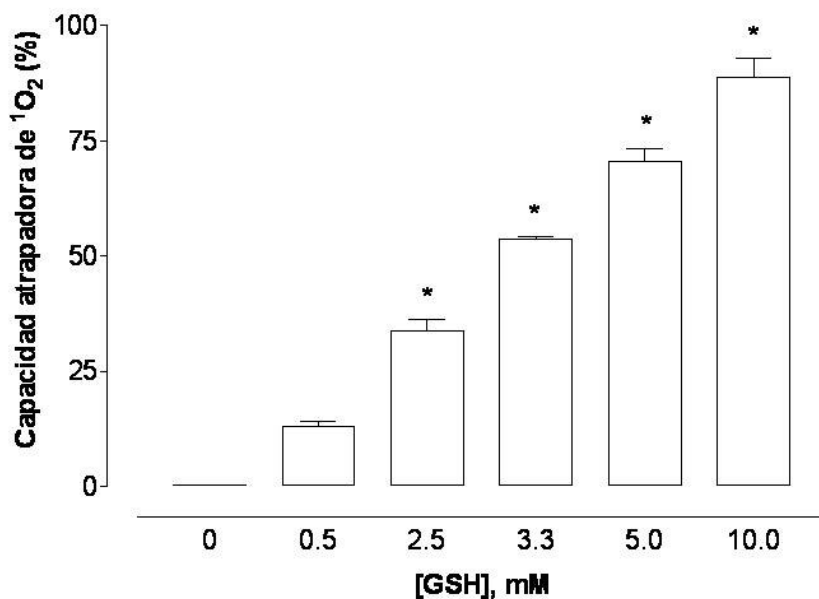


Figura 19. Capacidad atrapadora de GSH sobre  $^1O_2$ . Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE (n=7) \*p<0.001 vs 0 mM.

Para la realización del ensayo se preparó una solución concentrada de  $\alpha$ -mangostina en etanol, a partir de ésta se realizaron diluciones en agua por lo que el etanol también se diluyó. Las concentraciones que finalmente se emplearon se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones analizadas de  $\alpha$ -mangostina y etanol.

n=4	Intervalo de Concentraciones
$\alpha$ -mangostina en etanol	0.3 – 25 $\mu$ M
etanol	0.13 – 10.8 mM

La  $\alpha$ -mangostina no presentó capacidad atrapadora de  $^1\text{O}_2$  en las concentraciones analizadas. Al mismo tiempo, se analizó una serie que contenía las diferentes concentraciones de etanol en las que se disolvió  $\alpha$ -mangostina y se determinó que tampoco presentaba capacidad atrapadora de  $^1\text{O}_2$ .

### 6.5 Determinación de la capacidad atrapadora de $\text{ONOO}^-$ .

En este ensayo se utilizó DL-penicilamina como compuesto de referencia que es un producto de degradación de la penicilina y es un buen atrapador de  $\text{ONOO}^-$  (Medina-Campos et al., 2007). En la Figura 20 se muestra que la penicilamina atrapa  $\text{ONOO}^-$  de forma dependiente de la concentración. La capacidad atrapadora fue significativa a 9-450  $\mu$ M de penicilamina. El valor calculado de  $\text{Cl}_{50}$  es  $23.3 \pm 2.9 \mu\text{M}$ .

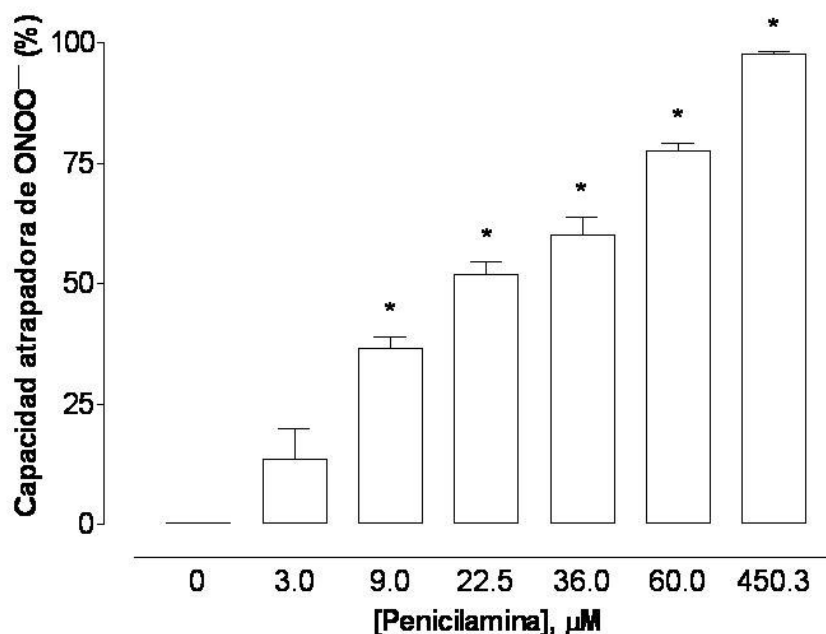


Figura 20. Capacidad atrapadora de penicilamina sobre  $\text{ONOO}^-$ . Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE (n=5) \*p<0.001 vs 0 mM.

Para la realización del ensayo se preparó una solución concentrada de  $\alpha$ -mangostina en DMSO puro y a partir de ésta se realizaron diluciones en agua, por lo que el DMSO también se diluyó; el intervalo de concentraciones que se utilizó de este disolvente fue 2.5-51 mM y se demostró que en estas concentraciones no atrapa  $\text{ONOO}^-$ .

En la Figura 21 se muestra que  $\alpha$ -mangostina atrapa  $\text{ONOO}^-$  de forma dependiente de la concentración. La capacidad atrapadora fue significativa a 20-144  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -mangostina.

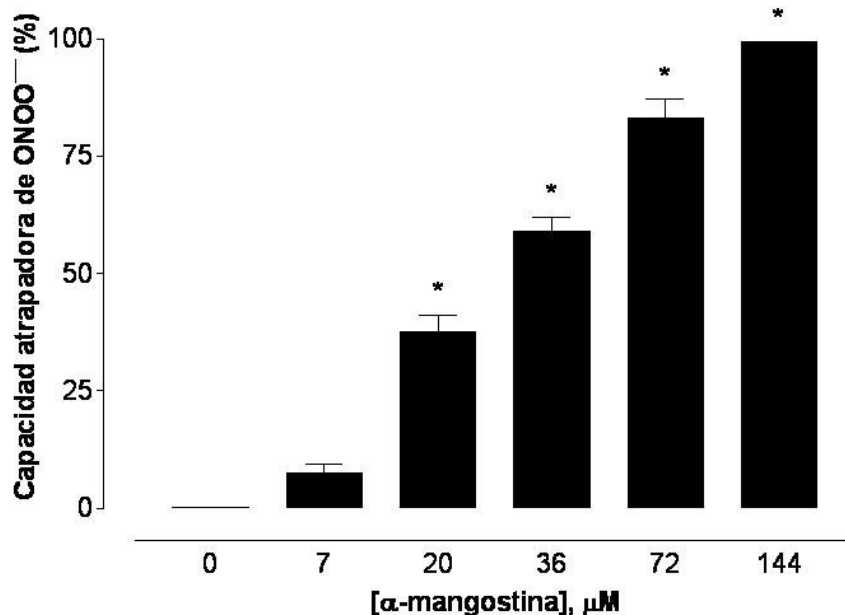


Figura 21. Capacidad atrapadora de  $\alpha$ -mangostina sobre  $\text{ONOO}^-$ . Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE (n=9) \*p<0.001 vs 0 mM.

El valor calculado de  $\text{CI}_{50}$  es  $28.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$ . En la Figura 22 muestra la comparación de la capacidad antioxidante de  $\alpha$ -mangostina y del NDGA. Se puede observar que no hay diferencia significativa entre éstos

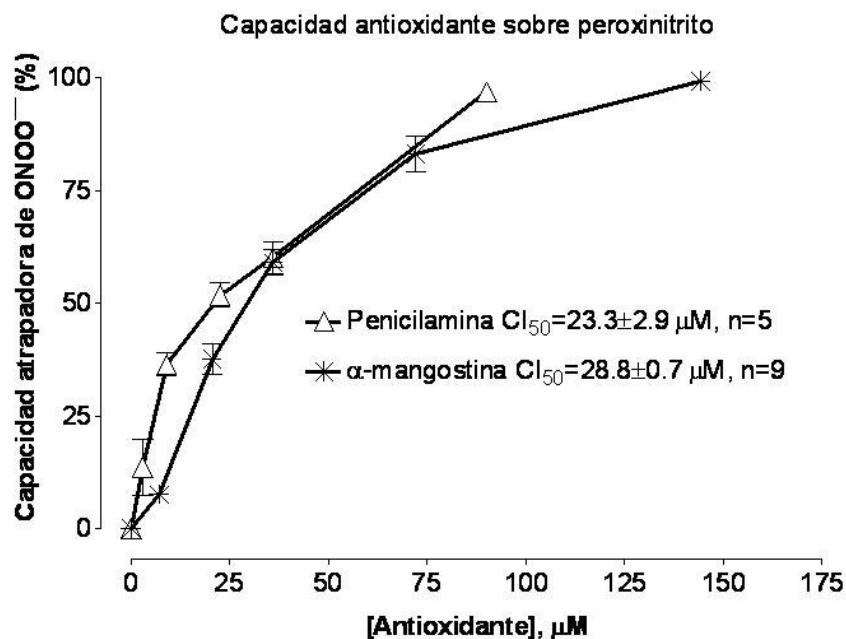


Figura 22. Capacidad atrapadora de  $\text{ONOO}^-$ . Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE.

En la Figura 23 se presenta la comparación estadística de la capacidad antioxidante de penicilamina y de  $\alpha$ -mangostina sobre  $\text{ONOO}^-$ , se observa que no hay diferencia significativa entre éstas, por lo que la capacidad antioxidante es igual para estos compuestos

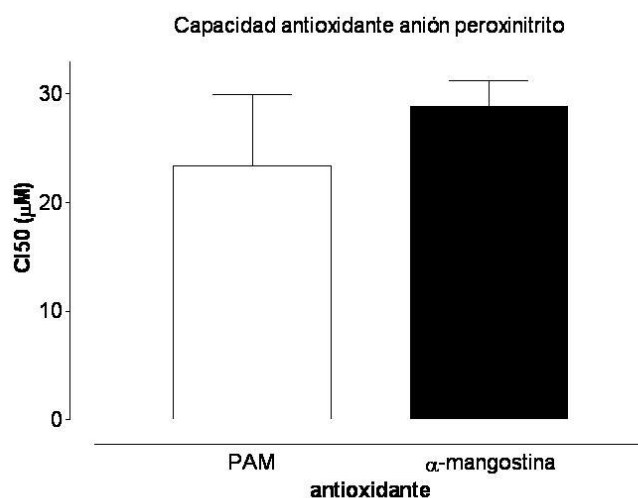


Figura 23. Comparación estadística de los valores  $\text{CI}_{50}$  de penicilamina y  $\alpha$ -mangostina. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EE.

La determinación de la capacidad atrapadora de las EROs se realizó utilizando principalmente métodos espectrofotométricos, una desventaja que se presentó fue la limitante de concentración y esto debido a la nula solubilidad de  $\alpha$ -mangostina en agua ya que por ejemplo en la determinación de  $\text{OH}^\bullet$  se evaluó una concentración máxima de  $\alpha$ -mangostina  $4.8 \mu\text{M}$  debido a que al utilizar mayores concentraciones precipitaba; sin embargo en la determinación de la capacidad atrapadora de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{ONOO}^-$ , ésta fue significativa a partir de  $20 \mu\text{M}$  de  $\alpha$ -mangostina, para ambas especies.

En la determinación de la capacidad atrapadora de  $\text{ONOO}^-$ , originalmente se realizaban mediciones espectrofotométricas, la mayor concentración que se podía evaluar era  $\alpha$ -mangostina  $36 \mu\text{M}$  y además no presentaba capacidad atrapadora; en cambio cuando se realizaron mediciones de fluorescencia con esta misma concentración, se obtuvo un porcentaje de atrapamiento del 60%. De acuerdo a todo lo anterior, es necesario evaluar la capacidad atrapadora con mayores concentraciones de  $\alpha$ -mangostina utilizando otros métodos en donde no se tenga interferencia por el tipo de solubilidad como en fluorescencia.

De acuerdo a los resultados  $\alpha$ -mangostina atrapa únicamente  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{ONOO}^-$  sin embargo cabe aclarar la importancia de estas especies, fundamentalmente porque ambas generan otras que son más reactivas.

De manera natural el organismo produce grandes cantidades de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  considerado relativamente benigno pues es inactivado por proteínas de hierro-azufre y por tanto no reacciona con la mayoría de las moléculas biológicas; sin embargo cuando el hierro es liberado de las proteínas el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  puede producir  $\text{OH}^\bullet$  y si reacciona con  $\text{NO}^\bullet$  puede producir  $\text{ONOO}^-$  (Winterbourn y Kettle, 2003), el cual es un oxidante más fuerte que sus precursores, puede reaccionar con un amplio intervalo de moléculas incluyendo DNA, proteínas y lípidos por lo que se ha implicado en diversas enfermedades que incluyen arteriosclerosis, inflamación y enfermedades neurodegenerativas; además como ya se mencionó esta especie sufre descomposición a pH fisiológico y produce oxidantes fuertes como  $\text{NO}_2^\bullet$ ,  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  y  $\text{OH}^\bullet$ .

Ambas especies generan  $\text{OH}^\bullet$  que es considerado una de las especies oxidantes más dañinas, pues se ha postulado que desempeñan un papel directo o indirecto en varias

condiciones patológicas como la isquemia cerebral, la enfermedad de Parkinson, artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares y la carcinogénesis también está implicado en diferentes procesos como la mutagénesis y envejecimiento (Cheng et al., 2002). Por lo tanto los efectos benéficos del mangostán sobre la salud pueden deberse, o relacionarse, al menos en parte, con su actividad antioxidante hacia  $O_2^{\bullet-}$  y  $ONOO^-$ .

También es importante considerar que un compuesto evaluado en un experimento *in vitro* no necesariamente presentará el mismo comportamiento *in vivo*; por lo que en este caso las propiedades antioxidantes de  $\alpha$ -mangostina pueden deberse a diferentes mecanismos como la inducción de enzimas antioxidantes actuando así como un antioxidante indirecto, por tanto se considera necesario también evaluar la capacidad antioxidante en modelos *in vivo*.

## 7. CONCLUSIONES.

La  $\alpha$ -mangostina no tiene la capacidad de atrapar  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\bullet$  y  $^1\text{O}_2$  con la metodología usada.

La  $\alpha$ -mangostina tiene la capacidad de atrapar las EROs:  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{ONOO}^-$ . Estas dos especies son de gran importancia ya que son precursoras de especies más oxidantes como:  $\text{OH}^\bullet$

Se determinó un valor de  $\text{CI}_{50} = 24.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$  de  $\alpha$ -mangostina para  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , sin embargo es menos efectiva que el NDGA  $\text{CI}_{50} = 6.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$ .

Se determinó un valor de  $\text{CI}_{50} = 28.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$  de  $\alpha$ -mangostina para  $\text{ONOO}^-$  y es igual de efectiva que la penicilamina  $\text{CI}_{50} = 23.3 \pm 2.9 \mu\text{M}$ .



## **8. PERSPECTIVAS.**

- 1.- Evaluar la capacidad antioxidante de la  $\alpha$ -mangostina por otros métodos fluorescentes para comprobar que no tiene la capacidad de atrapar las EROs:  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$  y  $^1O_2$ .
- 2.- Evaluar la capacidad antioxidante de la  $\alpha$ -mangostina en modelos *in vivo* con el fin conocer los otros mecanismos por los cuales presenta propiedades antioxidantes.
- 3.- Evaluar las propiedades antioxidantes de las otras xantonas presentes en el mangostán; determinando su capacidad atrapadora de las EROs.

## 9. REFERENCIAS.

- Aruoma OI. 1994a. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Methods in Enzymology* 233:57-66.
- Aruoma OI. 1994b. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 32(7):671-683.
- Aruoma OI. 1996. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radical Biology & Medicine* 20(5):675-705.
- Aruoma OI. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research* 523-524:9-20.
- Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverrí J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17(2):164-173.
- Chairungsrilerd N, Furukawa K, Ohta T, Nozoe S, Ohizumi Y. 1996a. Histaminergic and serotonergic receptor blocking substances from the medicinal plant *Garcinia mangostana*. *Planta Medica* 62(5):471-472.
- Chairungsrilerd N, Furukawa K, Ohta T, Nozoe S, Ohizumi Y. 1996b. Pharmacological properties of  $\alpha$ -mangostin, a novel histamine H1 receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology* 314(3):351-356.
- Cheng F, Jen J, Tsai T. 2002. Hydroxyl radical in living system and its separation methods. *Journal of Chromatography B* 781(1-2):481-496.
- Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. 2005. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* 101(1-3):330-333.
- Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. 2007. Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by *Propionibacterium acnes*. *Fitoterapia* 78(6):401-408
- Diplock AT. 1994. Antioxidants and disease prevention. *Molecular Aspects of Medicine* 15(4):293-376.
- Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J. 1998. Functional food science and defense against reactive oxidative species. *The British Journal of Nutrition* 80 (Suppl 1):S77-S112.
- Floriano-Sánchez E, Villanueva C, Medina-Campos ON, Rocha D, Sánchez-González DJ, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Nordihydroguaiaretic acid is 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 Radical Research* 40(5):523-533.
- Garrity A, Morton G, Morton J. 2004. Nutraceutical mangosteen composition. Unites States Patent, US 6,730,333 B1.
- Gopalakrishnan G, Banamathi B, Suresh G. 1997. Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. *Journal of Natural Products* 60(5):519-524.
- González-Cuahutencos O. 2007. Propiedades antioxidantes **in vitro** del mangostán (*Garcinia mangostana* L.). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

- Govindachari TR, Kalyanaraman PS, Muthukumaraswamy N. 1971. Xanthenes of *Garcinia mangostana* Linn. *Tetrahedron* 27(16):3919-3926.
- Halliwell B, Cross CE. 1994. Oxygen-derived Species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives* 102 Suppl 10:5-12.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 2001 *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd. Ed. Oxford Science Publications. Nueva York. Pp 192, 380-384.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. 1987. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry* 165:215-219.
- Halliwell B, Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology* 142(2):231-255.
- Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141(2):312-322.
- Hansberg W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico* 26:19-54.
- Huang YL, Chen CC, Chen YJ, Huang RL, Shieh BJ, 2001. Three xanthenes and a benzophenone from *Garcinia mangostana*. *Journal of Natural Products* 64(7):903-906.
- Iinuma 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*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48(8):861-865.
- Jefferson A, Quillinan AJ, Scheimann F, Sim KY, 1970. Isolation of  $\gamma$ -mangostin from *Garcinia mangostana* and preparation of the natural mangostins by selective demethylation. *Australian Journal of Chemistry* 23:2539-2543.
- 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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43(4):1270-1276.
- 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(11):3711-3713.
- Jung H, Su B-N, Keller W, Mehta R, Kinghorn A, 2006. Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(6):2077-2082.
- Kanati K, Atsumi M, Arakawa T, Oosawa K, Shimura S, Nakahata N, Ohizumi Y, 2002. Inhibitions of histamine release and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis by mangosteen, a Thai medicinal plant. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25(9):1137-1141.
- Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beackman JS, 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology & Medicine* 16(2):149-156.
- Mahabusarakam W, Wiriyaichitra P, 1987. Chemical constituents of *Garcinia Mangostana*. *Journal of Natural Products* 50(3): 474-478.
- Mahabusarakam W, Kiaha K, Wilairat P, Taylor W, 2006. Phenylated xanthenes as potential

antiplasmodial substances. *Planta Medica* 72:912-916.

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. *Journal of Natural Products* 66(8):1124-1127.

Matusumoto K, Asao Y, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Inhuma M, Nozawa Y, 2005. Xanthenes induce cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer DLD-1 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13(21):6064-6069.

Medina-Campos ON, Barrera D, Segoviano-Murillo S, Rocha D, Maldonado PD, Mendoza-Patiño N, Pedraza-Chaverri J, 2007. S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK(1) cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology* 45(10):2030-2039.

Moongkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. 2004a. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 90(1):161-166.

Moongkarndi P, Kosem N, Luanratana O, Jungsomboonkusol S, Pongpan N. 2004b. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia* 75(3-4):375-377.

Nabandith V, Suzui M, Morioka T, Kaneshiro T, Kinjo T, Matsumoto K, Akao Y, Iinuma M, Yoshimi N, 2004. Inhibitory effects of crude  $\alpha$ -mangotin, a xanthone derivative, on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1,2, dimethylhydrazine in the rat. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 5(4):433-438.

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. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 25:1137-1141.

Nagy S, Shaw P, 1980. Tropical and subtropical fruits. Composition, properties and uses. The AVI Publishing Company, Inc. Connecticut pp 407-411.

Nicoli M, Anese M, Parpinel M, 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology* 10:94-100.

Nguyen LH, Venkatraman G, Sim KY, Harrison LJ, 2005. Xanthenes and benzophenones from *Garcinia griffithii* and *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* 66(14):1718-1723.

Obregón S, 2008. Fisiología de la hipertensión arterial. "Evaluación del estrés oxidante". Universidad Austral consultado en [http://www.austral.edu.ar/biomedicas/pdf/2008-Evaluacion\\_del\\_estres\\_oxidante.pdf](http://www.austral.edu.ar/biomedicas/pdf/2008-Evaluacion_del_estres_oxidante.pdf). el 7 de marzo de 2008.

Olinescu R, Smith TL, 2002. Free Radicals in Medicine. Nova Science Publishers Inc. New York. 1ª edición pp 87-95.

Olivares-Corichi I, Medina-Navarro R, Torres-Ramos Y, Montes-Cortés D. 2006. Daño a proteínas por estrés oxidante: Lipoproteína de baja densidad e insulina. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 14(4);237-240.

Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macías-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, Castro L, Salcedo MI, Hernández-Pando R, 2004. S-allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and siglet oxygen *in vitro* and attenuates gentamicin-induced

oxidative and nitrosative stress and renal damage in vivo. *BMC Clinical Pharmacology* 4:5.

Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Orozco-Ibarra M, Pérez-Rolas J, 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Enviado a Food and Chemical Toxicology*.

Pinto MM., Sousa ME, Nascimento MS, 2005. Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Current Medicinal Chemistry* 12(21):2517-2538.

Riscoe M, Kelly JX, Winter R, 2005. Xanthenes as antimalarial agents: discovery, mode of action and optimization. *Current Medicinal Chemistry* 12(21):2539-2549.

Sakagami Y, Iinuma M, Piyasena KG, Dharmaratne HR, 2005. Antibacterial activity of  $\alpha$ -mangostin against vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) and synergism with antibiotics. *Phytomedicine* 12(3):203-208.

Shankaranarayan D, Gopalakrishnan C, Kameswaran L, 1979. Pharmacological profile of mangostin and its derivatives. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie* 239:257-2693.

Sierra Vargas M, Guzmán-Grenfell A, Olivares-Corichi I, Torres Ramos Y, Hicks Gómez J, 2004. Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 17(2):135-148.

Stout GH, Krahn MM, Yates P, Bhat HB, 1968. The structure of mangostin. *Chemical Communications*: 211-212.

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*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 51(7):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*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 54:301-305.

Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD, 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 46(10):4113-4117.

Vieira LM, Kijjoa A, 2005. Naturally-occurring xanthenes: recent developments. *Current medicinal chemistry* 12(21):2413-2446.

Walker EB, 2007. HPLC analysis of selected xanthenes in mangosteen fruit. *Journal of separation science* 30(9):1229-1234.

Wan A, 1973. *Garcinia mangostana*. High resolution NMR studies of mangostin. *Planta Medica* 24:297-300.

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). *Medical Principles and Practice* 15(4):281-287.

Williams P, Ongsakul M, Proudfoot J, Croft K, Beilin L, 1995. Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. *Free Radical Research* 23(2):175-184.

Winterbourn CC, Kettle AJ, 2003. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305(3): 729-736.

Xiong Y, Rabchevsky AG, Hall ED, 2007. Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *Journal of Neurochemistry* 100(3):639-649.

Yates P, Stout GH, 1958. The structure of mangostin. *Journal of the American Chemical Society* 80:1691-1700.

Yokoyama M, 2004. Oxidant stress and atherosclerosis. *Current Opinion in Pharmacology* 4(2):110-115.