



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA
RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR EL CONTENIDO
DE α -MANGOSTINA EN EL EXTRACTO
METANÓLICO DE *Garcinia mangostana*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :
ILIANA GARIBAY ESQUIVEL



México, D. F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

PRESIDENTE:	QFB. María Teresa Buentello Rodríguez
VOCAL:	QFB. María de los Dolores Campos Echeverría
SECRETARIO:	Dra. Blanca Estela Rivero Cruz
1er. Suplente:	QFB. Pedro Salvador Valadez Eslava
2do. Suplente:	M. en C. Kenneth Rubio Carrasco

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 113. Edificio E
Facultad de Química UNAM

Asesor

Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

Sustentante

Iliana Garibay Esquivel

"Las personas más bellas con las que me he encontrado son aquellas que han conocido la derrota, conocido el sufrimiento, conocido la lucha, conocido la pérdida, y han encontrado su forma de salir de las profundidades. Estas personas tienen una apreciación, una sensibilidad y una comprensión de la vida que los llena de compasión, humildad y una profunda inquietud amorosa. La gente más bella no surge de la nada."

Elisabeth Kübler Ross

Agradecimientos

El trabajo experimental del presente proyecto fue realizado mediante el apoyo económico otorgado a través del proyecto PAPIIT IA 200512.

A los miembros del jurado Blanca Estela Rivero Cruz, María Teresa Buentello Rodríguez y María de los Dolores Campos Echeverría por la revisión del manuscrito de tesis.

INDÍCE	PÁG.
Ø 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS -----	1
Ø 2. ANTECEDENTES -----	4
☞ 2.1 Generalidades de Garcinia mangostana -----	4
☞ 2.2 Distribución -----	6
☞ 2.3 Composición química -----	6
☞ 2.4 Xantonas y su clasificación -----	9
☞ 2.5 Actividad antifúngica y antibacteriana -----	11
☞ 2.6 Actividad antiinflamatoria -----	11
☞ 2.7 Actividad antioxidante -----	13
☞ 2.8 Actividad antitumoral -----	15
Ø 3. METODOLOGÍA -----	16
☞ 3.1 Preparación del extracto y obtención de la α-mangostina -----	16
☞ 3.2 Identificación del compuesto en el extracto mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia -----	16
☞ 3.3 Desarrollo del método analítico para cuantificar α-mangostina por cromatografía de líquidos de alta eficiencia. -----	17
☞ 3.4 Validación del método analítico -----	18
★ 3.4.1 Preparación de la solución patrón-----	18
★ 3.4.2 Evaluación de los parámetros de calidad-----	18
✦ 3.4.2.1 Adecuabilidad del sistema-----	18
✦ 3.4.2.2 Especificidad-----	18
✦ 3.4.2.3 Precisión-----	19
▲ 3.4.2.3.1 Precisión del sistema-----	19
▲ 3.4.2.3.2 Precisión el método (repetibilidad)-----	19
▲ 3.4.2.3.3 Precisión intermedia-----	20
✦ 3.4.2.4 Linealidad-----	20
▲ 3.4.2.4.1 Linealidad del sistema-----	20
▲ 3.4.2.4.2 Linealidad del método y exactitud-----	21
✦ 3.4.2.5 Robustez-----	22
☞ 3.5 Estabilidad de la α-mangostina -----	23

☞	3.6 Análisis de los diferentes productos que contienen α -mangostina-----	23
☞	4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	24
☞	4.1 Identificación del compuesto en el extracto -----	28
☞	4.2 Desarrollo del método analítico-----	29
☞	4.3 Validación del método analítico-----	29
★	4.3.1 Evaluación de los parámetros de desempeño -----	31
✦	4.3.1.1 Adecuabilidad del sistema -----	31
✦	4.3.1.2 Especificidad -----	32
✦	4.3.1.3 Precisión -----	34
▲	4.3.1.3.1 Precisión del sistema -----	35
▲	4.3.1.3.2 Precisión del método -----	35
▲	4.3.1.3.3 Precisión intermedia -----	36
✦	4.3.1.4 Linealidad-----	37
▲	4.3.1.4.1 Linealidad del sistema -----	38
▲	4.3.1.4.2 Linealidad del método-----	40
✦	4.3.1.5 Exactitud -----	43
✦	4.3.1.6 Robustez-----	44
☞	4.4 Estabilidad de la α -mangostina -----	50
☞	4.5 Análisis de los diferentes preparados que contienen α -mangostina -----	53
☞	5. CONCLUSIONES -----	59
☞	6. PERSPECTIVAS -----	60
☞	7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	61
☞	APÉNDICE I -----	65
★	Factor de capacidad -----	65
★	Número de platos teóricos-----	65
★	Resolución -----	66
★	Factor de coleo-----	66

LISTA DE CUADROS

No. de Cuadro	Nombre	Página
2.1	Xantonas encontradas y aisladas en el pericarpio de <i>G. mangostana</i> .	7-8
3.1	Condiciones cromatográficas establecidas para validar el método analítico desarrollado.	17
3.2	Condiciones experimentales para evaluar la especificidad del método analítico.	19
3.3	Diluciones empleadas para evaluar la linealidad del sistema.	20
3.4	Preparación de las curvas para evaluar la exactitud y la linealidad del método.	21
3.5	Factores evaluados para demostrar la robustez del método.	22
4.1	Parámetros cromatográficos calculados.	29
4.2	Adecuabilidad del sistema.	31
4.3	Resultados obtenidos durante la degradación de la α -mangostina.	32
4.4	Porcentajes de degradación para cada tratamiento.	32
4.5	Datos obtenidos para evaluar la precisión del sistema.	35
4.6	Datos obtenidos para evaluar la repetibilidad del método.	36
4.7	Análisis estadístico de los datos obtenidos para evaluar la reproducibilidad del método.	37
4.8	Parámetros estadísticos de la regresión lineal del sistema.	39
4.9	Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo de linealidad del sistema.	39
4.10	Análisis de varianza de la regresión lineal del sistema.	39
4.11	Datos obtenidos para evaluar la linealidad del método.	41
4.12	Parámetros estadísticos de la regresión lineal del método.	42
4.13	Intervalo de confianza al 95% de la ordenada al origen y la pendiente del	42

	modelo de linealidad del método.	
4.14	Análisis de varianza de la regresión lineal del método.	43
4.15	Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método.	44
LISTA DE CUADROS (continuación)		
4.16	Resultados obtenidos para evaluar la robustez del método.	46
4.17	Análisis de varianza para el modelo factorial.	46
4.18	% de degradación de la α -mangostina. Estabilidad.	52
4.19	Contenido de α -mangostina y especificaciones en la etiqueta de los suplementos alimenticios analizados.	55

LISTA DE FIGURAS

No. de Figura	Nombre	Página
2.1	Árbol maduro de <i>Garcinia mangostana</i> .	4
2.2	Hojas y fruto.	5
2.3	Sépalos y pulpa del fruto.	5
2.4	Pericarpio del fruto.	5
2.5	Distribución de <i>Garcinia mangostana</i> .	6
2.6 (a)	Núcleo base de las xantonas.	9
2.6 (b)	Estructuras químicas de las xantonas más estudiadas.	9-10
2.7	Mecanismo antiinflamatorio de la α -mangostina.	12
2.8	Esquema de neutralización de radicales libres.	13
4.1	Cromatograma obtenido con el extracto metanólico de <i>G. mangostana</i> .	28
4.2	Cromatograma correspondiente a una concentración de 100 μ g/mL de α -mangostina.	33
4.3	Cromatograma generado por la α -mangostina después de someterla a una hidrólisis ácida.	33
4.4	Cromatograma generado por la α -mangostina después de someterla a una hidrólisis básica.	34
4.5	Cromatograma generado por la α -mangostina después de someterla a una oxidación.	34
4.6	Cromatograma obtenido con una proporción de fase 70:30 ACN:H ₂ O-	47

	TFA, flujo de 0.5 mL/min y volumen de inyección 5 μ L.	
4.7	Cromatograma obtenido con una proporción de fase 70:30 ACN:H ₂ O-TFA, flujo de 0.5 mL/min y volumen de inyección 20 μ L.	48
LISTA DE FIGURAS (continuación)		
4.8	Cromatograma obtenido con una proporción de fase 70:30 ACN:H ₂ O-TFA, flujo de 1.5 mL/min y volumen de inyección 5 μ L.	48
4.9	Cromatograma obtenido con una proporción de fase 70:30 ACN:H ₂ O-TFA, flujo de 1.5 mL/min y volumen de inyección 20 μ L.	49
4.10	Cromatograma obtenido con una proporción de fase 90:10 ACN:H ₂ O-TFA, flujo de 0.5 mL/min y volumen de inyección 5 μ L.	49
4.11	Cromatograma obtenido con una proporción de fase 90:10 ACN:H ₂ O-TFA, flujo de 0.5 mL/min y volumen de inyección 20 μ L.	49
4.12	Cromatograma obtenido con una proporción de fase 90:10 ACN:H ₂ O-TFA, flujo de 1.5 mL/min y volumen de inyección 5 μ L.	50
4.13	Cromatograma obtenido con una proporción de fase 90:10 ACN:H ₂ O-TFA, flujo de 1.5 mL/min y volumen de inyección 20 μ L.	50
4.14	Cromatograma generado por la α -mangostina después de 1 mes de almacenamiento a 40°C y 70% de humedad.	51
4.15	Cromatograma generado por la α -mangostina después de 2 meses de almacenamiento a 40°C y 70% de humedad.	51
4,16	Cromatograma generado por la α -mangostina después de 3 meses de almacenamiento a 40°C y 70% de humedad.	52
4.17	Cromatograma generado con el estándar de α -mangostina.	53
4.18	Cromatograma obtenido con el suplemento alimenticio #1.	53
4.19	Cromatograma obtenido con el suplemento alimenticio #2.	54
4.20	Cromatograma obtenido con el	54

	suplemento alimenticio #3.	
4.21	Cromatograma obtenido con el suplemento alimenticio #4.	54
4.22	Suplementos alimenticios analizados, en donde se muestra que el marbete no está indicado correctamente.	56-57

LISTA DE GRÁFICAS

No. de Gráfica	Nombre	Página
4.1	Linealidad del sistema.	38
4.2	Gráfica de residuos para el modelo de linealidad del sistema.	40
4.3	Linealidad del método	41
4.4	Gráfica de residuos para el modelo de linealidad del método.	43
4.5	Gráfica interacciones entre los factores.	47
4.6	Gráfica de contornos de la superficie de respuesta estimada fijando el volumen de inyección a 0.0 µL (Factor C).	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	NOMBRE
ACN	Acetonitrilo
H ₂ O	Agua
TFA	Ácido trifluoroacético
MeOH	Metanol
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	Hidróxido de sodio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil *radical libre
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina
MIC	Mínima concentración inhibitoria
µg	Microgramo
mg	Miligramo
g	Gramo
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
min	Minuto
cm	Centímetro
µM	Micromolar

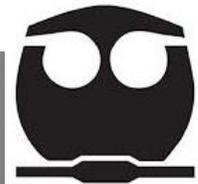
UV	Ultravioleta
DER	Desviación estándar relativa
CV	Coefficiente de variación
β_0	Ordenada al origen
β_1	Pendiente de la recta
LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)	
r	Coefficiente de correlación
r^2	Coefficiente de determinación
ABC	Área bajo la curva
DL₅₀	Dosis letal cincuenta
CI₅₀	Máxima actividad inhibitoria
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
H₀	Hipótesis alternativa
H₁	Hipótesis nula
gl	Grados de libertad
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada
NOM	Norma Oficial Mexicana
k'	Factor de capacidad
NPT	Número de platos teóricos
t_R	Tiempo de retención
LDL	Lipoproteína de baja densidad
M	Molar



1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

A nivel mundial el consumo de productos elaborados a base de hierbas, se debe a la preocupación del público por los efectos secundarios, cada vez más frecuentes, de los medicamentos alopáticos, a la continua búsqueda de opciones terapéuticas alternativas para el tratamiento de enfermedades crónicas, como la artritis y el eczema, y a los elevados costos de la medicina alopática. De manera general, los productos elaborados con las plantas tienen una amplia aceptación en los distintos sectores de la sociedad, tanto de las clases sociales medias como altas. Este último sector encuentra a este tipo de medicina novedosa y eficaz.

El incremento en el interés y el consumo de la medicina herbolaria no solo se refleja en las altas ventas de estos productos sino también en las múltiples publicaciones de textos sobre farmacología, toxicología, botánica, química y algunos aspectos clínicos de plantas medicinales. Títulos como el *Journal of Ethnopharmacology*, *Phytotherapy Research* y *Phytomedicine*, entre otros, se han unido a la amplia gama de publicaciones en esta área como *Planta Medica*, *Phytochemistry* y el *Journal of Natural Products*. Todas estas publicaciones han incrementado constantemente su factor de impacto en los últimos años. Existe además un marcado interés por los organismos regulatorios de los países desarrollados para incluir formulaciones de medicina tradicional en sus programas de salud. En la India, por ejemplo, el sistema de medicina tradicional juega un rol importante en la atención primaria de la salud. La medicina Ayurvédica es uno de los sistemas de medicina alternativa más antiguos del mundo en el que los médicos preparan sus propias formulaciones para evitar que los pacientes consuman productos adulterados o no éticos. Estas circunstancias determinaron la necesidad de publicar, en 1940, los estándares de calidad (especificaciones) relacionados con los productos y los procesos de manufactura de las especialidades de la medicina Ayurvédica, Siddha y Unani (ASU). De manera adicional a estas especificaciones el gobierno de la India introdujo, en el año 2000, el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura para dichos productos. Este importante paso en la mejora de la calidad y la manufactura de los productos ASU permitió que el público retomara la confianza en los 9000 productos con licencia suministrados en las farmacias.



Por otra parte, la seguridad y la eficacia de los productos farmacéuticos dependen de la calidad de los insumos utilizados para su manufactura. Los estándares de calidad aceptables son convencionalmente establecidos en las monografías farmacopeicas. Dichas monografías proporcionan un resumen con las especificaciones y los detalles de la metodología a utilizar para determinar la identidad, las impurezas y el contenido de principio activo necesario para lograr el efecto deseado. Las muestras deben evaluarse contra los ensayos especificados y cumplir con los criterios establecidos para ser denominadas con calidad farmacopeica.

En el marco de las plantas medicinales es importante mencionar que el término monografía es utilizado para designar dos diferentes tipos de especificaciones. Como ya se mencionó previamente, la monografía farmacopeica contiene únicamente las especificaciones de calidad mínimas para evaluar los insumos. El segundo tipo de monografía reúne la información de la planta relacionada con los constituyentes químicos, la farmacología, la toxicología, los estudios clínicos y los usos de la misma. En este sentido, las monografías farmacopeicas de plantas medicinales han evolucionado de manera notable. El considerable avance en el conocimiento de los constituyentes químicos responsables del efecto biológico o clínico de algunas plantas medicinales y, el desarrollo de las técnicas analíticas apropiadas para su análisis han permitido conformar algunas monografías farmacopeicas con los estándares adecuados de calidad para el análisis de los vegetales. Sin embargo, a pesar del valioso progreso en el desarrollo de dichas monografías su cantidad es aún muy limitada considerando la premura con la que los productos herbolarios aparecen en el mercado mundial. La carencia global de dichos estándares ha propiciado la amplia variabilidad en la "calidad" del material vegetal utilizado para elaborar los productos herbolarios. En casos extremos, los preparados se elaboran con la parte de la planta o la especie incorrecta pero, con mayor frecuencia, contienen material vegetal con bajo contenido de principios activos. Un menor grado de calidad también se debe al material vegetal contaminado con hongos, insectos u otras infestaciones que produzcan efectos tóxicos. En años recientes se ha documentado un tipo especial de adulteración que consiste en adicionar fármacos sintéticos a los suplementos y productos herbolarios. Las situaciones más comunes han sido la adición de fármacos como la dexametasona, el diclofenaco sódico y el metocarbamol en preparados para el alivio del dolor y la incorporación de grandes cantidades de sildenafil



en productos publicitados como suplementos para mejorar el desempeño corporal. Este ambiente ha propiciado además que los profesionales de la salud sean cautelosos en la prescripción de dichos productos. Es evidente, que la falta de personal capacitado para realizar e interpretar los análisis de estos productos es otro de los factores que contribuyen a la falta de calidad de los productos comerciales.

Con base en estas consideraciones el objetivo de este proyecto reside en desarrollar y validar un método analítico para cuantificar el contenido de α -mangostina en el extracto metanólico derivado del pericarpio del fruto del mangostán y en productos herbolarios que contengan *Garcinia mangostana* como ingrediente.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de *Garcinia mangostana*

Garcinia mangostana Linn (Guttiferae) es un árbol tropical que mide entre 6 y 25 metros de altura. Su tronco es recto, con ramas opuestas que le proporcionan una forma cónica o piramidal (Figura 2.1). La corteza es de color marrón oscuro y posee canales resiníferos que segregan un látex espeso color amarillo o verdoso. El árbol crece lentamente de 8-10 años después de la siembra. Presenta hojas opuestas, de peciolo corto, elíptico-ovaladas, de 10 a 20 cm de largo por 5 a 10 cm de ancho, con el nervio central bien marcado y nervios laterales prominentes y paralelos (Figura 2.2) (Pedraza-Chaverri, *et al.*, 2008).

Las flores tienen un diámetro de 5 cm, los pétalos son cortos y gruesos y sólo nace una en la parte final de la rama. El fruto (Figura 2.3) es morado o rojizo, su pulpa es comestible, blanca, suave, ligeramente ácida, de sabor dulce y aroma agradable. *G. mangostana* es considerada la reina de las frutas tropicales debido a su exquisito sabor. El pericarpio del fruto (Figura 2.4) ha sido utilizado como agente medicinal para el tratamiento de infecciones y heridas de la piel y para tratar la amibiasis y la disentería. En la medicina Ayurvédica el pericarpio también se ha utilizado ampliamente para curar la diarrea, el cólera, la disentería y como agente anti-inflamatorio (Jung *et al.*, 2006).



Figura 2.1. Árbol maduro de *Garcinia mangostana*.



Figura 2.2. Hojas y fruto.



Figura 2.3. Sépalos y pulpa del fruto.



Figura 2.4. Pericarpio del fruto.

2.2 Distribución

G. mangostana se conoce popularmente con los nombres de mangostán, mangosteen y mangkhut, entre otros. La especie es un árbol tropical de la India, Myanmar, Malasia, Filipinas, Sri Lanka y Tailandia (Figura 2.5) y se encuentra asociada a las selvas lluviosas donde la humedad es alta y permanente (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2008).



Figura 2.5. Distribución de *Garcinia mangostana*.

2.3 Composición química

Desde el punto de vista fitoquímico *G. mangostana* contiene una gran variedad de metabolitos secundarios pertenecientes a la categoría de las xantonas oxigenadas y preniladas. La literatura química describe el aislamiento de 50 xantonas aisladas a partir del pericarpio del fruto. La primera de ellas fue aislada en 1855 y se denominó α -mangostina. Posteriormente, se describió el aislamiento y la caracterización de la β y γ -mangostina; la gartanina y la 8-desoxigartanina; las garcinonas A-E; la mangostinona y el mangostanol, entre otras. En el Cuadro 2.1 se resumen las xantonas mayoritarias aisladas a partir del pericarpio de la especie. Por otro lado, en la Figura 2.6b se ilustran las estructuras químicas de las xantonas más estudiadas desde el punto de vista biológico.

Cuadro 2.1. Xantonas aisladas a partir del pericarpio de *G. mangostana*.

Xantona	Referencia
α -mangostina	Schmid, 1855; Yates y Stout, 1958; Stout y Krahn, 1968.
β -mangostina	Dragendorff, 1930; Yates y Bhat, 1968; Mahabusarakam <i>et al.</i> , 1987.
γ -mangostina	Jefferson <i>et al.</i> , 1970; Mahabusarakam <i>et al.</i> , 1987; Jinsart <i>et al.</i> , 1992.
mangostanol	Chairungsrilerd, 1996a; Suksamrarn <i>et al.</i> , 2002 y 2003; Huang <i>et al.</i> , 2001.
mangostenol	Suksamrarn <i>et al.</i> , 2002 y 2003.
1-isomangostina	Mahabusarakam <i>et al.</i> , 1987; Jung <i>et al.</i> , 2006.
1-hidrato de isomangostina	Mahabusarakam <i>et al.</i> , 1987.
3-isomangostina	Huang <i>et al.</i> , 2001; Mahabusarakam <i>et al.</i> , 1987.
3-hidrato de isomangostina	Mahabusarakam <i>et al.</i> , 1987.
1,6-dihidroxi-7-metoxi-8-isoprenil-6'6'-dimetilpirano(2'3':3,2)xantona	Suksamrarn <i>et al.</i> , 2003.
toxiloxantona A (trapeziloxantona)	Suksamrarn <i>et al.</i> , 2002 y 2003.
calabaxantona	Mahabusarakam <i>et al.</i> , 1987; Sen <i>et al.</i> , 1980a.
desmetilcalabaxantona	Mahabusarakam <i>et al.</i> , 1987; Suksamrarn <i>et al.</i> , 2003.
caloxantona A	linuma <i>et al.</i> , 1996.
macluraxantona	linuma <i>et al.</i> , 1996.
1,7-dihidroxixantona	linuma <i>et al.</i> , 1996.
euxantona	Gopalakrishnan <i>et al.</i> , 1997.
cuadraxantona	Jung <i>et al.</i> , 2006.
8-hidroxicuadraxantona G	Jung <i>et al.</i> , 2006.
esmeatxantona A	Jung <i>et al.</i> , 2006.
BR-xantona A	Balasubramanian y Rajagopalan, 1988.
BR-xantona B	Balasubramanian y Rajagopalan, 1988.
mangostina	Suksamrarn <i>et al.</i> , 2003.
mangostenona A	Suksamrarn <i>et al.</i> , 2002, 2003.
mangostenona B	Suksamrarn <i>et al.</i> , 2002.
mangostinona	Asai <i>et al.</i> , 1995; Suksamrarn <i>et al.</i> , 2002 y 2003; Matsumoto <i>et al.</i> , 2003.
gartanina	Govindachari <i>et al.</i> , 1971; Mahabusarakam <i>et al.</i> , 1987; Asai <i>et al.</i> , 1995.
8-desoxigartinona	Gopalakrishnan <i>et al.</i> , 1997; Govindachari <i>et al.</i> , 1971; Huang <i>et al.</i> , 2001.
garcinona A	Sen <i>et al.</i> , 1980b, 1982.

Cuadro 2.1. (continuación)	
garcinona B	Sen <i>et al.</i> , 1980b y 1982; Huang <i>et al.</i> , 2001; Suksamrarn <i>et al.</i> , 2002, 2003.
garcinona C	Sen <i>et al.</i> , 1980b y 1982.
garcinona D	Sen <i>et al.</i> , 1986; Gopalakrishnan <i>et al.</i> , 1997; Huang <i>et al.</i> , 2001.
garcinona E	Dutta <i>et al.</i> , 1987; Sakai <i>et al.</i> , 1993; Asai <i>et al.</i> , 1995.
garcimangosona A	Huang <i>et al.</i> , 2001.
garcimangosona B	Jung <i>et al.</i> , 2006; Huang <i>et al.</i> , 2001.
garcimangosona C	Huang <i>et al.</i> , 2001.
garcimangosona D	Huang <i>et al.</i> , 2001.
tovofilina A	Huang <i>et al.</i> , 2001; Ho <i>et al.</i> , 2002; Jung <i>et al.</i> , 2006.
tovofilina B	Huang <i>et al.</i> , 2001; Suksamrarn <i>et al.</i> , 2002 y 2003.
1,5-dihidroxi-2-isoprenil-3-metoxixantona	Asai <i>et al.</i> , 1995; linuma <i>et al.</i> , 1996; Huang <i>et al.</i> , 2001.
mangostingona [7-metoxi-2-(3-isoprenil)-8-(3metil-2-oxo-3-butenil)-1,3,6-trihidroxixantona	Jung <i>et al.</i> , 2006.
5,9-dihidroxi-2,2-dimetil-8-metoxi-7-isoprenil-2H,6H-pirano[3,2-<i>b</i>] xanto-6-ona	Sen <i>et al.</i> , 1980b; Huang <i>et al.</i> , 2001; Chairungrilerd, 1996a.
2-(γ,γ-dimetilali)-1,7-dihidroxi-3-metoxixantona	Mahabusarakam <i>et al.</i> , 1987.
2,8-Bis-(γ,γ-dimetilalil)-1,3,7-trihidroxixantona	Mahabusarakam <i>et al.</i> , 1987.
1,3,7-trihidroxi-2,8-di-(3-metilbut-2-enil)xantona	Mahabusarakam <i>et al.</i> , 1987.
1,7-dihidroxi-2-isoprenil-3-metoxixantona	Asai <i>et al.</i> , 1995; linuma <i>et al.</i> , 1996; Huang <i>et al.</i> , 2001.
2,7-disoprenil-1,3,8-trihidroxi 4-metilxantona	Gopalakrishnan y Balaganesan, 2000.
2,8-disoprenil-7-carboxi-1,3-dihidroxantona	Gopalakrishnan y Balaganesan, 2000.
2-isoprenil-1,7-dihidroxi-3-metoxixantona	Matsumoto <i>et al.</i> , 2003.
1,3,6,7-tetrahidroxi-8-(3metil-2-butenil)-9H-xanto-9-ona	Huang <i>et al.</i> , 2001.

Cuadro 2.1. Xantonas aisladas a partir del pericarpio de *G. mangostana*.

2.4 Xantonas y su clasificación

El núcleo base de las xantonas se conoce como 9-xantenona o dibenzo- γ -pirona y es simétrico (Figura 2.6). Las xantonas son productos naturales que se encuentran en algunas familias de plantas superiores, hongos y líquenes. Se clasifican en cinco grupos denominados:

- Xantonas oxigenadas
- Xantonas glicosiladas
- Xantonas preniladas
- Xantonolignoides
- De otro tipo (miscellaneous)

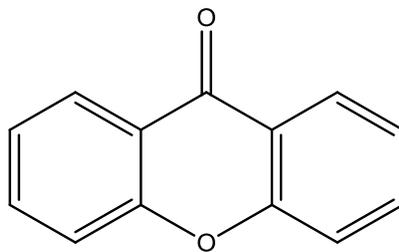
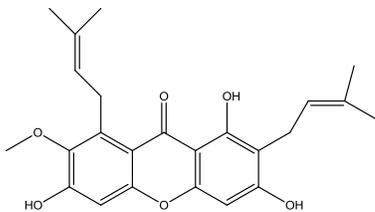
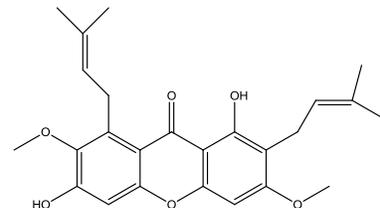


Figura 2.6a. Núcleo base de las xantonas

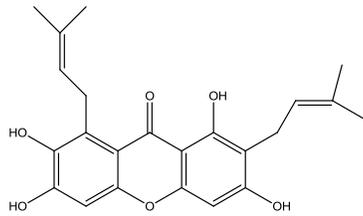
Figura 2.6b. Estructuras químicas de las xantonas más estudiadas.



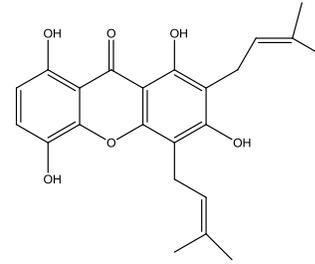
a) α -mangostina



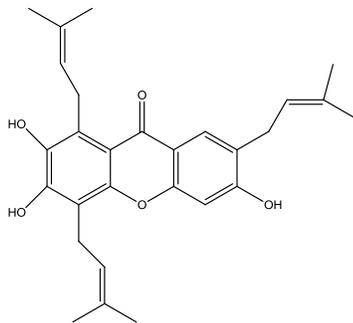
b) β -mangostina



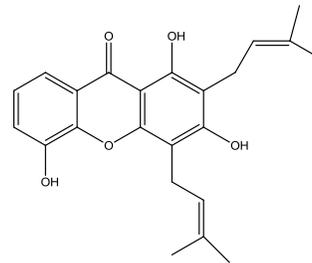
c) γ -mangostina



d) garcinona



e) garcinona E



f) 8-desoxigarcinona

Durante el periodo comprendido entre los años 2000-2004 fueron identificadas 278 nuevas xantonas a partir de 20 familias de plantas superiores; de 14 especies de hongos y de 3 especies de líquenes (Vieira y Kijjoa, 2005).

Desde el punto de vista biológico *G. mangostana* ha sido objeto de varios estudios farmacológicos realizados tanto *in vitro* como *in vivo*. Las propiedades biológicas mejor estudiadas son la antioxidante, la antitumoral, la anti-inflamatoria, la antialérgica, la antibacteriana, la antifúngica y la antiviral. En los siguientes párrafos se describen algunos de los aspectos más relevantes de estas propiedades (Pedraza-Chaverrí, *et al.*, 2008).

☞ 2.5 Actividad antifúngica y antibacteriana

En 1983 Sundaram y colaboradores estudiaron las propiedades antibacterianas y antifúngicas de la α -mangostina y de cuatro de sus derivados. Los autores encontraron que las especies *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *Epidermophyton floccosum*, *Alternaria solani*, *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.* y *Cunninghamella echinulata* fueron altamente susceptibles a las xantonas. Por otro lado, especies como *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*, *E. coli*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp.*, *Fusarium roseum* y *Curvularia lunata* fueron moderadamente susceptibles. Las concentraciones mínimas inhibitorias para la α -mangostina fueron de 12.5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ para las bacterias y de 1 a 5 $\mu\text{g/mL}$ para los hongos (Sundaram *et al.*, 1983).

Otros investigadores estudiaron el efecto de varias xantonas utilizando cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina y a la meticilina (MRSA). En los dos casos la α -mangostina mostró la mayor eficacia. En el 2003, Suksamran y colaboradores estudiaron el potencial antituberculosis de las xantonas preniladas aisladas a partir del pericarpio del fruto. Los resultados indicaron que la α y β -mangostina junto con la garcinona B presentaron el efecto inhibitorio más potente contra *Mycobacterium tuberculosis* (MIC 6.25 $\mu\text{g/mL}$). Otros estudios describen el potente efecto inhibitorio del extracto y la α -mangostina sobre *Propionibacterium acnes* y *S. epidermidis* (agentes etiológicos del acné) y el potencial antibacterial del extracto etanólico y la α -mangostina contra cepas resistentes a los antibióticos en hospitales (Suksamran *et al.*, 2003; Chomnawang *et al.*, 2005).

☞ 2.6 Actividad antiinflamatoria

En 1979 Shankaranarayan y coautores describieron el efecto antiinflamatorio de la α -mangostina y otros análogos utilizando como modelo el edema plantar del ratón inducido por carragenina. En 1996, otro grupo de investigación reportó que el extracto metanólico del pericarpio inhibió las concentraciones inducidas por histamina y serotonina en la aorta torácica aislada de conejo y la tráquea de rata. Los autores encontraron que la xantona inhibe de manera dosis-dependiente las contracciones inducidas por histamina en presencia o no de la cimetidina; un antagonista de los receptores H_2 de la histamina.

La α -mangostina inhibió también las concentraciones mediadas por el receptor H_1 de la histamina (Shankaranarayan *et al.*, 1979; Chairungsrilerd *et al.*, 1996c).

Por otro lado, las xantonas α y γ -mangostina aisladas de las cáscaras de la fruta bloquearon la producción de la óxido nítrico sintasa inducida (NOS) y la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2).

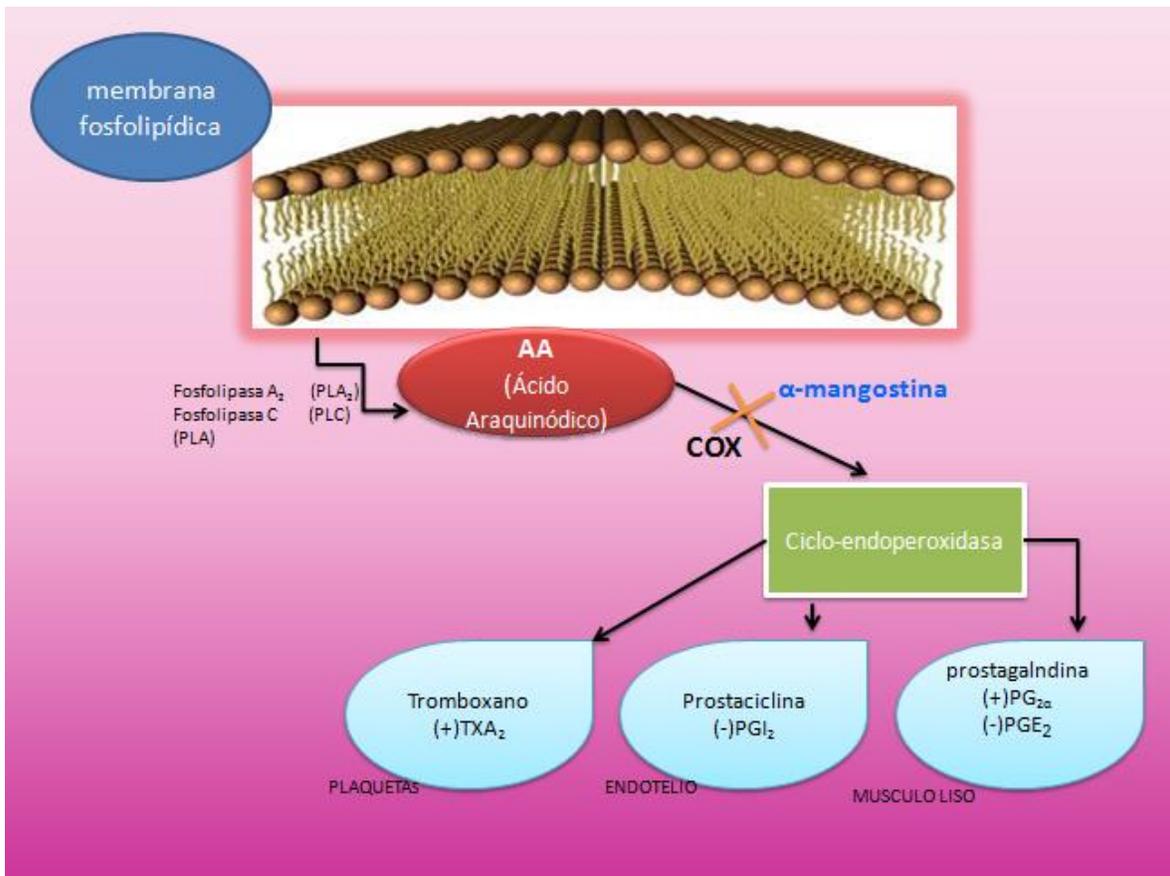


Figura 2.7. Mecanismo antiinflamatorio de la α -mangostina.

2.7 Actividad antioxidante

En la actualidad el estrés oxidativo se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de radicales libres que provocan un daño oxidativo a las biomoléculas y que no pueden ser contrarrestados por los sistemas antioxidantes naturales (Figura 2.8).

Se ha vinculado el exceso de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno con varias enfermedades incluyendo el cáncer, los desórdenes cardiovasculares, la diabetes mellitus, la inflamación y las enfermedades neurodegenerativas (Young-Won y Douglas, 2008., Valko, *et al.*, 2007).

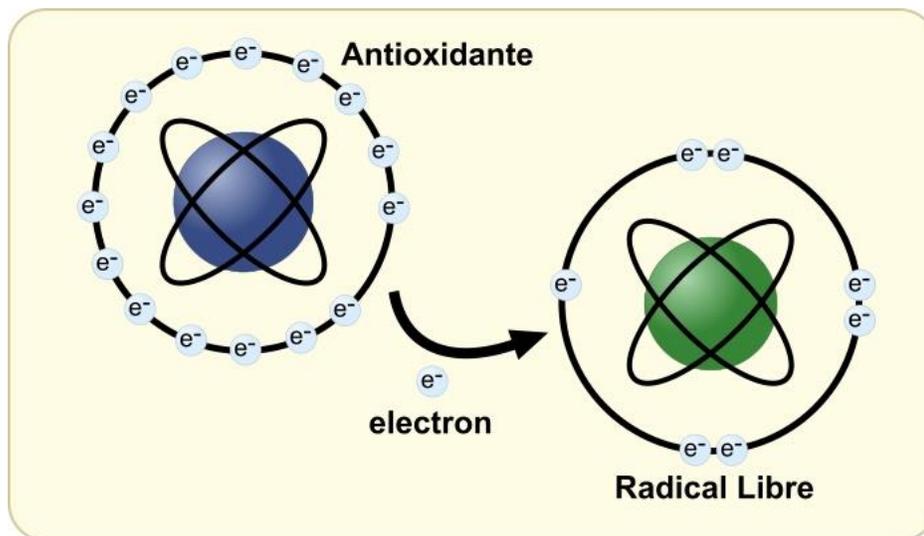


Figura 2.8. Esquema de neutralización de radicales libres

Dentro de los antioxidantes naturales, el extracto metanólico del fruto del magostán (originario de Vietnam), demostró un potente efecto eliminador de radicales. Los productos naturales con mayor efecto antioxidante fueron las xantonas α y γ -mangostina, junto con la (-)-epicatequina y las procianidinas A-2 y B.

La actividad antioxidante de los extractos y de las xantonas aisladas de *G. mangostana* se ha demostrado mediante el método del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) (Pedraza-Chaverri *et al*, 2008, Yoshikawa *et al.*, 1994; Leong and Shui, 2002; Weecharangsan *et al.*, 2006; Chomnawang *et al.*, 2007; Haruenkit *et al.*, 2007, Fan and Su, 1997). Mientras que la actividad de los radicales libres se ha evaluado utilizando el tiocianato férrico y el 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico, ABTS).

En otro estudio, Williams y colaboradores (1995) encontraron que la α -mangostina disminuye la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) inducidas por cobre o por el radical peróxido. Se encontró que la α -mangostina y sus derivados sintéticos previenen la disminución del consumo de α -tocoferol inducido por la oxidación de las LDL. Cabe mencionar que cuando se modifica la estructura química de la α -mangostina cambia su actividad antioxidante. Por ejemplo, al sustituir en C-3 y C-6 un grupo metilo, acetato, propanodiol o nitrilo se reduce la actividad antioxidante (Jihong Cui, *et al.*, 2010, Mahabusarakam *et al.*, 2000).

Se han realizado estudios sobre propiedades antioxidantes y neuroprotectivas de cuatro extractos obtenidos del pericarpio del mangostán. La capacidad antioxidante fue evaluada utilizando el método del DPPH a concentraciones de 1, 10, 50, y 100 $\mu\text{g/mL}$ de los extractos acuosos y etanólicos (50%), respectivamente. Todos los extractos mostraron una alta capacidad antioxidante (inhibitorias a la concentración del 50%). Finalmente, la capacidad antioxidante de los extractos fue probada en líneas celulares de neuroblastoma (NG108-15) expuestas a peróxido de hidrógeno (H_2O_2); ambos extractos muestran actividad neuroprotectiva cuando se usan concentraciones de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Pedraza-Chaverri *et al*, 2008).

☞ 2.8 Actividad antitumoral

En el 2002 Ho y colaboradores evaluaron el efecto citotóxico de 6 xantonas aisladas a partir del pericarpio del fruto de *G. mangostana*. Los investigadores encontraron que la garcinona E tiene un potente efecto citotóxico sobre las líneas celulares del carcinoma hepatocelular SK-Hep-1, HA22T, HEPG2, Hep3B y HCC36. Los valores de la DL₅₀ calculada para esta xantona se encuentra entre 0.1 y 5.4 μ M. Posteriormente, Matsumoto y coautores descubrieron el efecto inhibitorio de la α , β y γ -mangostina sobre el crecimiento de la línea celular causante de la leucemia en humanos HL60. En este estudio la máxima actividad inhibitoria (CI₅₀ 10 μ M) del crecimiento celular fue demostrada por la α -mangostina. En el 2004, los mismos autores, reportaron que esta xantona induce la apoptosis de las células HL60 mediante la activación de las caspasas 3 y 9, disminuyendo el potencial de la membrana mitocondrial y liberando el citocromo C y ROS. Estos resultados indicaron que la mitocondria juega un papel primordial en la inducción de la apoptosis por la α -mangostina (Ho, *et al*, 2002).

Otros investigadores reportaron que la administración de la α -mangostina en la dieta inhibió significativamente el desarrollo de algunos de los biomarcadores de la carcinogénesis del colón en ratas. En otro estudio Chiang y colaboradores reportaron que el extracto preparado con agua caliente a partir del pericarpio del fruto mostró una potente actividad antileucemia con valores de CI₅₀ de 61 ± 9.9 y 159 ± 12 μ g/mL sobre las líneas K562 y Raji, respectivamente (Chiang, *et al*, 2004).

Finalmente, otras investigaciones describen el efecto antiproliferativo del extracto metanólico del pericarpio del fruto y de la α -mangotina sobre el cáncer de mama. En resumen, los resultados de las investigaciones sugieren que la α -mangostina podría ser utilizada como candidata para prevenir el cáncer.



3. METODOLOGÍA

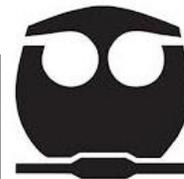
3.1 Preparación del extracto y obtención de la α -mangostina

Preparación del extracto orgánico. El pericarpio seco de *Garcinia mangostana* fue adquirido comercialmente en la empresa Food and Beverage Online. 250 g del material vegetal se sometieron a un proceso de maceración durante 3 semanas utilizando CH_2Cl_2 -MeOH (1:1; 1L) como disolvente de extracción. Al término de este proceso la solución obtenida se filtró y se concentró a presión reducida.

El extracto obtenido (20.5 g) se sometió a un fraccionamiento primario, vía cromatografía en columna, utilizando sílica gel como adsorbente y mezclas de hexano- CH_2Cl_2 como fase móvil. El proceso generó 5 fracciones primarias. De la fracción número 5 precipitó de manera espontánea un sólido amarillo caracterizado por métodos espectroscópicos y espectrométricos como la α -mangostina.

3.2 Identificación del compuesto en el extracto mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

La identificación del marcador químico en el extracto metanólico del pericarpio del fruto se realizó mediante la coelución del estándar de α -mangostina con el extracto bajo análisis. Para ello, se prepararon las soluciones del estándar y del extracto a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ empleando MeOH como disolvente. Los perfiles cromatográficos se registraron empleando una columna Purospher STAR RP-18 de 4.6 mm de diámetro interno por 15 cm de longitud y con un tamaño de partícula de 5 μm . La fase móvil empleada consistió en una mezcla binaria de disolventes compuesta por ACN:H₂O-TFA (ácido trifluoroacético) al 0.1% en una proporción 80:20. La longitud de onda empleada para la detección fue de 340 nm; un flujo de 1.0 mL/min; un volumen de inyección de 10 μL y una temperatura de 25°C.



3.3 Desarrollo del método analítico para cuantificar α -mangostina por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LabSolution/LCsolution. El desarrollo del método analítico se llevó a cabo empleando una columna C18 y una mezcla binaria de disolventes. La respuesta utilizada para evaluar los parámetros de validación fue el área bajo la curva (ABC). También se registraron la resolución, el factor de coe, el factor de capacidad y el número de platos teóricos. En resumen, las condiciones cromatográficas que permitieron validar la metodología analítica conducente a la cuantificación de la α -mangostina en el extracto y los suplementos alimenticios se resumen en el Cuadro 3.1.

Fase móvil	Mezcla binaria ACN:H₂O 0.1% TFA
Temperatura	25°C
Flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección	10 μ L
Longitud de onda	340 nm

Cuadro 3.1. Condiciones cromatográficas establecidas para validar el método analítico desarrollado.



☞ 3.4 Validación del método analítico

★ 3.4.1 Preparación de la solución patrón

10 mg de α -mangostina se disolvieron en 10 mL de metanol. La concentración de esta solución es de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

★ 3.4.2 Evaluación de los parámetros de calidad

✦ 3.4.2.1 Adecuabilidad del sistema

Este parámetro de desempeño se evaluó mediante el análisis por quintuplicado de una solución que contenía 50 $\mu\text{g/mL}$ de α -mangostina preparada por dilución a partir de la solución patrón. Los parámetros registrados fueron el factor de coe (T) y el número de platos teóricos (NTP). El criterio de aceptación establecido por los protocolos de validación establece que el CV obtenido de la respuesta del analito sea menor al 2.0%.

✦ 3.4.2.2 Especificidad

Este parámetro de calidad del método se determinó mediante la evaluación del efecto de la oxidación y las hidrólisis ácida y básica sobre la α -mangostina. Las muestras se prepararon pesando, por separado, 5 mg del flavonoide y se disolvieron en 5 mL de MeOH. Enseguida, se adicionó a cada muestra 2 mL de los reactivos indicados en el Cuadro 3.2 y se sometió a un proceso de reflujo durante 1h. Las soluciones resultantes fueron analizadas en el sistema cromatográfico para determinar la generación de productos de degradación y estimar su porcentaje.

El criterio de aceptación para este parámetro de calidad establece que la respuesta debe corresponder únicamente al analito de interés es decir, los productos de degradación no deben interferir con su tiempo de retención.



	α -mangostina (1000 $\mu\text{g/mL}$)	Reactivo adicionado	Tiempo y método empleado
Hidrólisis Ácida	5 mL	HCl (1M)	Reflujo, 60 min.
Hidrólisis Básica	5 mL	NaOH (1M)	Reflujo, 60 min.
Oxidación	5 mL	H ₂ O ₂ 10%	Reflujo, 60 min.

Cuadro 3.2 .Condiciones experimentales para evaluar la especificidad del método analítico.

✦ 3.4.2.3 Precisión

▲ 3.4.2.3.1 *Precisión del sistema*

La precisión del sistema se evaluó mediante el análisis de seis soluciones preparadas a la concentración establecida como el 100% (50 $\mu\text{g/mL}$). Las soluciones fueron preparadas por diluciones independientes a partir de la misma solución patrón. Después de su análisis en el sistema cromatográfico se calculó la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) de la respuesta analítica. El criterio de aceptación establecido para este parámetro indica que el CV no debe exceder del 1.5% para ser considerado como preciso.

▲ 3.4.2.3.2 *Precisión el método (repetibilidad)*

La repetibilidad del método se evaluó mediante la preparación, por triplicado, del extracto matanólico de *G. mangostana* conteniendo 52.2 $\mu\text{g/mL}$ de α -mangostina. Con la respuesta analítica obtenida se calculó la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV). El criterio de aceptación para este parámetro establece que el coeficiente de variación (CV) no debe ser mayor al 2.0%.



▲ 3.4.2.3.3 *Precisión intermedia*

La precisión intermedia se evaluó mediante el análisis por triplicado de una solución estándar de α -mangostina en dos días y por dos analistas diferentes. Con el área bajo la curva obtenida como respuesta analítica se calculó la media aritmética (\bar{y}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV). Para cumplir con este parámetro se requiere que el CV sea menor al 2.0%.

✦ 3.4.2.4 Linealidad

▲ 3.4.2.4.1 *Linealidad del sistema*

La linealidad del sistema se evaluó por medio de la preparación de tres curvas de calibración con cinco niveles de concentración y preparadas por pesadas independientes. A partir de una solución stock se prepararon las diluciones necesarias para que cada mililitro de las mismas contuvieran 10, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/mL}$ del analito. En el Cuadro 3.3 se resume el esquema de diluciones empleado.

Concentración de la solución stock de α -mangotina	Nivel de concentración	Volumen de la alícuota (mL)	Aforo con MeOH (mL)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
100 $\mu\text{g/mL}$	1	1.0	10	10
100 $\mu\text{g/mL}$	2	2.5	10	25
100 $\mu\text{g/mL}$	3	5.0	10	50
100 $\mu\text{g/mL}$	4	7.5	10	75
1000 $\mu\text{g/mL}$	5	2.5	25	100

Cuadro 3.3. Diluciones empleadas para evaluar la linealidad del sistema en las curvas de calibración.



El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante un modelo de regresión lineal con las variables concentración (x) y área bajo la curva (y) y se calculó la ordenada al origen (β_0), la pendiente de la recta (β_1), el coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de correlación (r).

Los criterios de aceptación establecidos para este parámetro son: $r^2 > 0.98$; $r \geq 0.999$; el intervalo de confianza para la pendiente IC (β_1) no debe incluir el cero mientras que, el intervalos de la ordenada al origen IC (β_0) si debe contenerlo.

▲ 3.4.2.4.2 Linealidad del método y exactitud

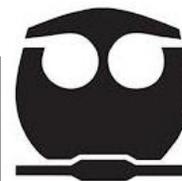
La linealidad del método y la exactitud se evaluaron preparando, por triplicado, una curva con cinco niveles de concentración que van de 10-100 $\mu\text{g/mL}$ de α -mangostina. A cada nivel de concentración se adicionó un volumen constante (2.0 mL) de la matriz de trabajo (extracto) que contenía 2.2 $\mu\text{g/mL}$ de α -mangostina. En Cuadro 3.4 se resume el esquema de trabajo empleado para la preparación de las curvas.

Concentración de la solución stock	Nivel de concentración	Volumen de la alícuota (mL)	Alicuota (mL) de la solución del extracto (2.2 $\mu\text{g/mL}$)	Aforo final con MeOH (mL)
100 $\mu\text{g/mL}$	1	1.0	2.0	10
	2	2.5	2.0	10
	3	5.0	2.0	10
	4	7.5	2.0	10
	5	2.5	2.0	25

Cuadro 3.4. Preparación de las curvas para evaluar la exactitud y la linealidad del método.

Para demostrar la linealidad del método se realizó una regresión lineal entre la cantidad adicionada (x) y la cantidad recuperada (y) y se calcularon los siguientes parámetros: β_0 , β_1 , r y r^2 .

Los criterios de aceptación establecidos para este parámetro son: $r^2 > 0.98$; $r \geq 0.999$; el intervalo de confianza de la pendiente IC (β_1) no debe contener el cero pero sí la unidad y el intervalo de confianza para la ordenada al origen IC (β_0) debe incluir el cero.



Por otro lado, para determinar la exactitud de la metodología se calculó el porcentaje de recobro para cada muestra adicionada empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Concentración experimental}}{\text{Concentración teórica}} * 100$$

De nueva cuenta se calculó, para cada nivel, el promedio aritmético y la desviación estándar relativa (DER). El método analítico es exacto si los porcentajes de recuperación se encuentran entre el 98.0%-102.0% y el coeficiente de variación del porcentaje de recobro no es mayor del 2.0%.

✦ 3.4.2.5 Robustez

La robustez del método se evaluó mediante un diseño de experimentos factorial 2³. Los factores seleccionados fueron la composición de la fase móvil, el flujo y el volumen de inyección (Cuadro 3.5). La muestra utilizada para los análisis consistió en el extracto metanólico de *G. mangostana* a la concentración encontrada como 100%. La respuesta medida en cada experimento fue la resolución del pico correspondiente al analito. El efecto de cada factor se evaluó mediante el análisis por duplicado de todas las combinaciones posibles entre los factores. Con los resultados obtenidos se calculó el modelo estadístico.

Flujo (mL)	Proporción de ACN:H ₂ O-TFA(0.1%) (%)	Vol. de inyección (µL)
0.5	70:30	5
0.5	70:30	20
1.5	70:30	5
1.5	70:30	20
0.5	90:10	5
0.5	90:10	20
1.5	90:10	5
1.5	90:10	20

Cuadro 3.5. Factores evaluados para demostrar la robustez del método analítico.



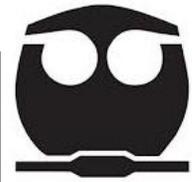
☞ 3.5 Estabilidad de la α -mangostina

La estabilidad de la α -mangostina se evaluó mediante el análisis del efecto de la temperatura y la humedad relativa durante 1, 2 y 3 meses. Para ello, diferentes viales con 5 mg del flavonoide se almacenaron a 40°C y 70% de humedad en una estufa marca BINDER KBF 115 # 05-77286. Transcurrido el tiempo de almacenamiento se analizaron las muestras disolviéndolas en metanol y diluyendo adecuadamente hasta obtener la concentración correspondiente al 100% (50 μ g/mL). Una vez preparadas las muestras se inyectaron bajo las condiciones cromatográficas establecidas para el método.

☞ 3.6 Análisis de los diferentes productos que contienen α -mangostina

Una vez validada la metodología analítica ésta se aplicó para cuantificar el contenido de α -mangostina en diferentes productos que contienen mangostán y se expenden en las tiendas naturistas como suplementos alimenticios.

Previa determinación del contenido promedio (de cada suplemento alimenticio) se colocaron en maceración el contenido de 20 cápsulas con 150 mL de metanol durante 24 h. El extracto resultante se filtró y se concentró a presión reducida. Posteriormente, 10 mg de cada extracto se disolvieron en 10 mL de metanol. Finalmente, 2 mL de la solución así obtenida se filtraron a través de un filtro marca PALL, GxP/GHP de 45 μ m para su análisis cromatográfico.

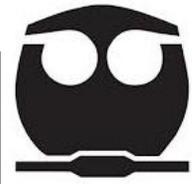


4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actualmente, el número de pacientes que utiliza terapias alternativas con plantas medicinales para mejorar su estado de salud presenta un crecimiento exponencial. La medicina basada en el uso de hierbas representa la síntesis de las experiencias terapéuticas acumuladas, por cientos de generaciones, de los practicantes de los sistemas medicinales indígenas. Este conocimiento etnomédico, ha permitido en cierta medida el desarrollo de la asistencia sanitaria primaria en los pueblos. Sin embargo, la industrialización y la pérdida de las culturas étnicas y sus costumbres han propiciado que una parte de esta información desaparezca. Aún más, la información etnomédica encontrada en la literatura científica sobre el uso de plantas curativas no ha sido recopilada adecuadamente para difundir su aprovechamiento.

Desde hace varias décadas, los investigadores en el campo de los productos naturales, han tratado de separar los componentes activos a partir de las plantas medicinales. En consecuencia, para un cierto número de plantas se ha logrado esclarecer el mecanismo de acción de los principios que validan su uso en la terapéutica. El surgimiento de toda una corriente para elaborar productos estandarizados de plantas con principios activos identificados ha dado paso a una nueva gama de medicinas herbolarias (medicamentos o remedios) que se encuentran disponibles para el público.

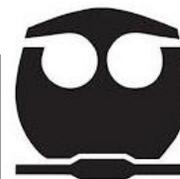
La visión reduccionista de la medicina alopática, ha limitado los estudios clínicos de las formulaciones elaboradas con extractos íntegros de plantas o de sus partes. Sin embargo, algunos autores establecen que evaluar los principios activos aislados a partir de las plantas contrasta con la realidad ya que, la mayoría de los consumidores utilizan las plantas completas. Asegurar la calidad de estos productos es un reto difícil ya que, los extractos están constituidos por cientos de compuestos que pueden antagonizar o sinergizar múltiples efectos. Por esta razón, paralelo a la búsqueda de nuevos fármacos a partir de plantas medicinales deben diseñarse pruebas clínicas que consideren a las plantas como productos completos, donde su totalidad sea mayor que la suma de sus partes (Mendoza, 2008).



Por otra parte, el auge de los suplementos alimenticios en México es una actividad que ha rebasado la capacidad de la Secretaría de Salud para regular la publicidad y el mercado de dichos productos. La principal vía que utilizan los fabricantes para aumentar sus ventas son los anuncios en televisión, radio, revistas e internet. El éxito de estos preparados entre el público se debe principalmente a las estrategias convincentes que utilizan dichos medios para incrementar las bondades de unos productos que, en la mayoría de los casos, no se encuentran debidamente autorizados.

El deterioro de las estructuras del sector salud, la insuficiencia del servicio público para atender las crecientes necesidades de la población y los elevados costos de la medicina alópata, son factores que han propiciado el uso de tratamientos “alternativos” por parte del público. Esta situación generó la emergencia de un mercado conformado no sólo por la población con graves carencias, sino también por sectores medios y altos que buscan encontrar otras opciones a los tratamientos farmacológicos para combatir enfermedades como la obesidad, la diabetes, el cáncer o bien para mejorar diferentes funciones corporales. El interés del público por consumir productos alternos ha dado paso a toda una corriente de preparados elaborados con plantas, vitaminas, minerales y otros productos. Aún más, la publicidad de estos productos es fraudulenta ya que son presentados como artículos eficaces para el tratamiento, prevención y cura de diversas enfermedades sin que su calidad y seguridad haya sido comprobada desde un punto de vista científico. Actualmente, su consumo es considerado un problema de salud ya que lejos de restablecer la homeostasis pueden ocultar síntomas, generar efectos adversos de naturaleza desconocida o exacerbar la condición debido a la presencia de ingredientes nocivos. Asimismo, su publicidad induce al abandono de los tratamientos con medicamentos alopáticos agravando así, el cuadro clínico de los pacientes.

Por otro lado, otro de los problemas que enfrenta la Secretaría de Salud son los suplementos adulterados y falsificados. De acuerdo con el Artículo 206 de la Ley General de Salud un producto adulterado es aquel cuya naturaleza y composición no corresponde con lo que se etiquete, anuncie, expendo o suministre; cuando no corresponda con las especificaciones de su autorización o, cuando haya sufrido un tratamiento que disimule su alteración, se encubran defectos en su proceso o en la calidad sanitaria de las materias



primas utilizadas. Asimismo, se considera falsificado un producto cuando se fabrique, envase o venda haciendo referencia a una autorización que no existe; se utilice una autorización legalmente otorgada a otro o, se imite al legalmente fabricado y registrado (Artículo 207, LGS).

Cabe mencionar que la falsificación y adulteración de los insumos representa el fenómeno más amplio para la difusión de productos que no cumplen con las normas establecidas en materia de calidad, seguridad y eficacia. Las etiquetas de estos productos incluyen, de manera deliberada, información falsa acerca de su calidad. Algunos casos de productos falsificados o adulterados incluyen: productos que no contienen ninguno de los ingredientes activos mencionados en la etiqueta; productos que contienen ingredientes activos diferentes a los especificados en la etiqueta; productos que contienen los ingredientes activos especificados pero en concentración diferente a la declarada; productos que pueden contener diferentes impurezas o diferentes cantidades de las mismas.

En los países industrializados, la mayor parte de la venta de los insumos falsificados y adulterados se realiza a través de internet. Este medio representa una amenaza para todas las personas que buscan tratamientos alternativos para enfermedades crónicas o letales a menor costo. En este sentido, el trabajo de la Organización Mundial de la Salud reside en ayudar a reforzar la legislación farmacéutica de los países para asegurar la presencia de la garantía de calidad en toda la cadena de distribución de insumos. La propagación de medicamentos falsificados es en general más pronunciada en los países donde la fabricación, la importación, la distribución, el suministro y la venta de medicamentos están menos reglamentados.

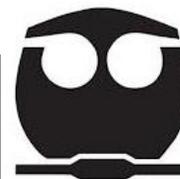
En este marco de referencia, resulta importante destacar que la situación de los suplementos alimenticios en nuestro país es desestimulante. La falsificación o adulteración de estos productos es una constante debido a la tendencia dinámica actual en la producción y venta de estos productos y, al insuficiente control legal y sanitario al que están sujetos. La popularidad creciente de los suplementos alimenticios puede expresarse también, de modo indirecto, en ciertas omisiones por parte del sistema de salud oficial, en el sentido de no generar medicamentos más accesibles para la población.



En el 2010, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) señaló la existencia en el mercado de 22 mil marcas de suplementos alimenticios pertenecientes a 568 empresas que se comercializaban sin ningún control.

En México, la COFEPRIS, a través de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAyAC) realiza los ensayos de laboratorio de todos aquellos productos sujetos a un control sanitario; incluidos los suplementos alimenticios. Sin embargo, su alcance para analizar los insumos es muy limitado considerando la premura con la que los productos aparecen en el mercado. Aún más, el análisis cuantitativo de estos productos es un reto difícil de abordar ya que representan matrices multicomponente y en algunos casos no existen estándares de calidad convencionalmente aceptados.

Con base en estos antecedentes el objetivo principal de este trabajo consistió en desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia para cuantificar a la α -mangostina en el extracto metanólico y los productos que contengan *Garcinia mangostana* entre sus componentes. El análisis sistemático de estos productos permitirá además, evaluar la calidad de las materias empleadas en la elaboración de dichos productos. Cabe mencionar que actualmente no existe en el mercado nacional ningún producto herbolario o suplemento alimenticio que tenga registro sanitario ante la COFEPRIS y contenga entre sus ingredientes *G. mangostana*.



4.1 Identificación del compuesto en el extracto

La identificación del flavonoide (α -mangostina) en el extracto se llevó a cabo mediante la comparación e identificación de su tiempo de retención así como, de la absorbancia presentada por la señal del estándar con aquella obtenida para el extracto. De manera adicional, se realizó una co-elución del estándar con la matriz de trabajo utilizada para validar el método. El tiempo de retención obtenido para la α -mangostina fue de 7.45 min. En la Figura 4.1 se ilustra el perfil cromatográfico del extracto utilizado como matriz de trabajo. Como se observa en dicha figura la señal mayoritaria corresponde a la α -mangostina.

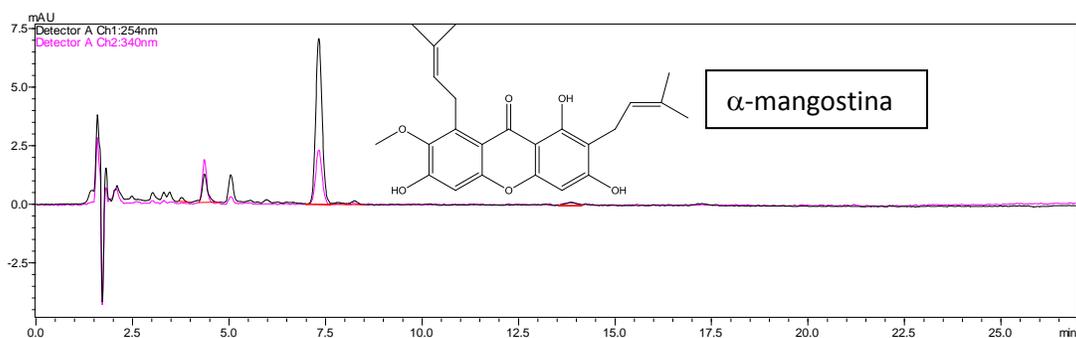
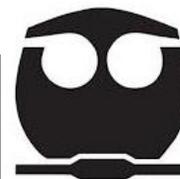


Figura 4.1. Cromatograma obtenido con el extracto metanólico de *G. mangostana*.



4.2 Desarrollo del método analítico

El desarrollo del método analítico se llevó a cabo mediante una revisión de los métodos que se han publicado en la literatura química para determinar la presencia de la xantona (α -mangostina) en diferentes matrices vegetales. De este modo, se probaron varias condiciones cromatográficas hasta obtener la mejor resolución de las señales para la identificación y cuantificación de la α -mangostina siendo éstas: el uso de una columna Purospher STAR RP-18, de 15 x 4.6 mm, una mezcla binaria de disolventes (ACN:H₂O-TFA 0.1%) y un flujo de 1.0 mL/min.

Después de establecer las condiciones cromatográficas del método de cuantificación se calcularon los siguientes parámetros cromatográficos:

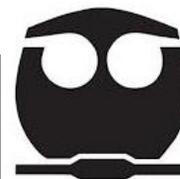
	α -mangostina
Factor de capacidad (K')	0.941
Factor de coileo (T)	1.109
Números de platos teóricos	8815.780
Resolución (R) con respecto a la señal anterior	10.924

Cuadro 4.1. Parámetros cromatográficos calculados.

La definición de cada parámetro cromatográfico se encuentra descrita en el Apéndice I.

4.3 Validación del método analítico

La validación de un método es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método, satisfacen los requisitos para su aplicación analítica. Por otra parte, los métodos analíticos utilizados para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos están sujetos a varios requisitos de acuerdo con la normatividad vigente y con otros documentos legales nacionales e internacionales. La Secretaría de Salud, a través de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) establece que los métodos analíticos que no estén publicados en este documento deben ser validados.

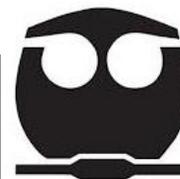


De acuerdo con este documento los métodos analíticos para fines de validación se clasifican en cuatro categorías ya que requieren diferentes esquemas de estudio:

- CATEGORÍA I. Método analítico para cuantificar un componente específico en muestras de producto terminado o en pruebas de estabilidad ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos.
- CATEGORÍA II. Métodos analíticos para la determinación de impurezas (productos de degradación, sustancias relacionadas, isómeros ópticos, etc.) en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos. Estos métodos pueden incluir determinaciones cuantitativas o pruebas límite. Los métodos de pureza quedan incluidos en esta categoría.
- CATEGORÍA III. Métodos analíticos utilizados en la determinación de una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico.
- CATEGORÍA IV. Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, o preparados farmacéuticos, cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés (FEUM, 2011).

Los parámetros de desempeño recomendados para la validación de métodos pertenecientes a la categoría I son: la precisión y la linealidad del sistema; la especificidad/selectividad; la linealidad y la precisión del método y la exactitud. La adecuabilidad del sistema, la tolerancia y la robustez pueden ser evaluadas opcionalmente dependiendo de la naturaleza del método.

Tomando en cuenta estas consideraciones, en el presente trabajo, se evaluaron todos los parámetros de desempeño mencionados anteriormente excepto la tolerancia del método. En todos los casos los criterios de aceptación fueron los reportados en las guías emitidas por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos y la International Conference on Harmonisation (García *et al.*, 2002; ICH, 2005).



★ 4.3.1 Evaluación de los parámetros de desempeño

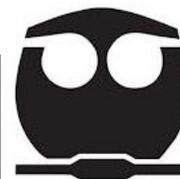
✦ 4.3.1.1 Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema es una parte integral de muchos procedimientos analíticos entre ellos, los cromatográficos. Este parámetro indica si un sistema es adecuado para la ejecución del análisis. Las pruebas de adecuabilidad del sistema están basadas en el concepto de que el equipo, los dispositivos electrónicos, la operación analítica y las muestras constituyen un sistema analítico único (FEUM, 2011).

La evaluación de este parámetro de calidad se realizó diariamente para el marcador químico a través del registro del área bajo la curva de una solución a una concentración de 50 µg/mL. Así, el coeficiente de variación que se obtuvo para la α-mangostina fue menor al 2.0%, indicando con ello, que el sistema es adecuado para llevar a cabo el análisis. En el Cuadro 4.2 se resumen los datos obtenidos para una corrida analítica y se observa que el coeficiente de variación obtenido es de 0.9%.

	α-mangostina
Factor de coleo	1.1
No. de platos teóricos	8815.8
Adecuabilidad	Área
Inyección 1	2105217
Inyección 2	2054144
Inyección 3	2079422
Inyección 4	2087944
Inyección 5	2080927
ȳ	2081530.8
s	18418.8
CV	0.9

Cuadro 4.2. Adecuabilidad del sistema.



✦ 4.3.1.2 Especificidad

La especificidad/selectividad es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra, que pueden estar presentes (especificidad) o que pudieran presentarse por efectos ambientales y/o de interacción con los mismos componentes (selectividad) tales como impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra. La falta de especificidad en un procedimiento analítico individual puede ser compensado por otro procedimiento analítico de apoyo (ICH, 1994).

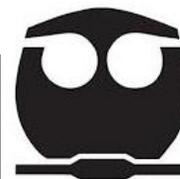
Para evaluar la selectividad del método el estándar se sometió a 3 diferentes condiciones de degradación. En los Cuadro 4.3 y 4.4 y, en las Figuras 4.3-4.6 se resumen los resultados obtenidos para cada condición evaluada así como los porcentajes de degradación calculados.

α -mangostina		
Muestra	t_R (min)	Área bajo la Curva
Estándar 1	7.4	37387228
Estándar 2	7.4	44944698
Degradación ácida 1	7.4	5937953
Degradación ácida 2	7.4	6003204
Degradación ácida 3	7.4	5961725
Degradación básica 1	7.2	39131839
Degradación básica 2	7.2	39154400
Degradación básica 3	7.3	39610746
Oxidación 1	7.5	29721603
Oxidación 2	7.7	27421718
Oxidación 3	7.4	29434286

Cuadro 4.3. Resultados obtenidos durante la degradación de la α -mangostina.

α -mangostina		
	% de degradación	CV
Hidrólisis ácida	85.5	0.6
Hidrólisis básica	4.5	0.7
Oxidación	29.6	4.7

Cuadro 4.4. Porcentajes de degradación para cada tratamiento.



De manera general, los productos generados durante la degradación no interfieren con la señal del marcador químico. Como se observa en el Cuadro 4.4 y en las Figuras 4.3-4.5 las condiciones básicas y de oxidación generaron una degradación del 4.5% y 29.6%, respectivamente. Por otro lado, la condición ácida generó un 85.5% de degradación. Con base en los resultados obtenidos se concluye que la respuesta obtenida en las condiciones cromatográficas utilizadas se debe exclusivamente a la presencia de la α -mangostina. Por lo tanto, el método analítico propuesto es específico y selectivo.

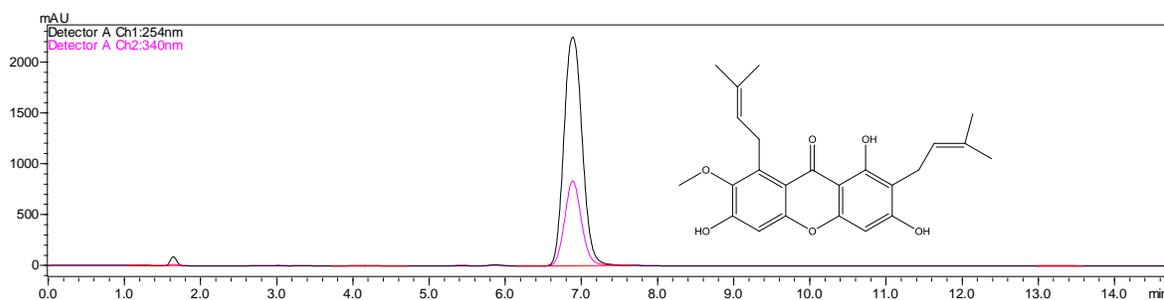


Figura 4.2. Cromatograma correspondiente a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de α -mangostina.

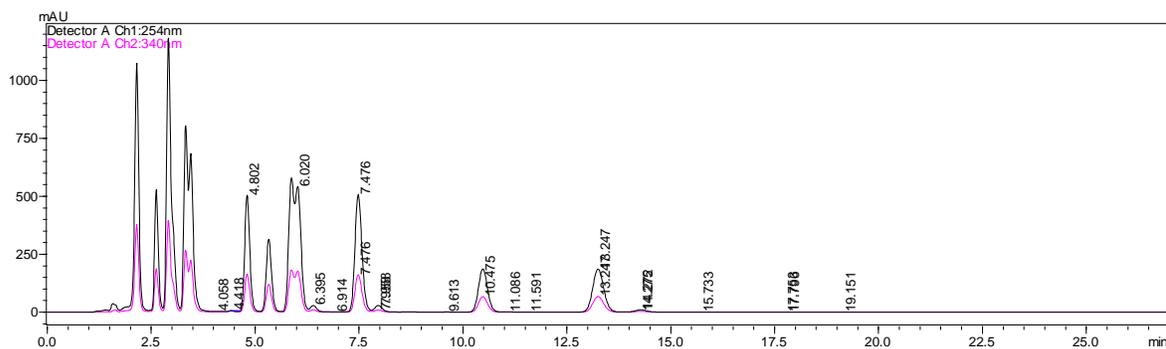


Figura 4.3. Cromatograma generado por la α -mangostina después de someterla a una hidrólisis ácida.

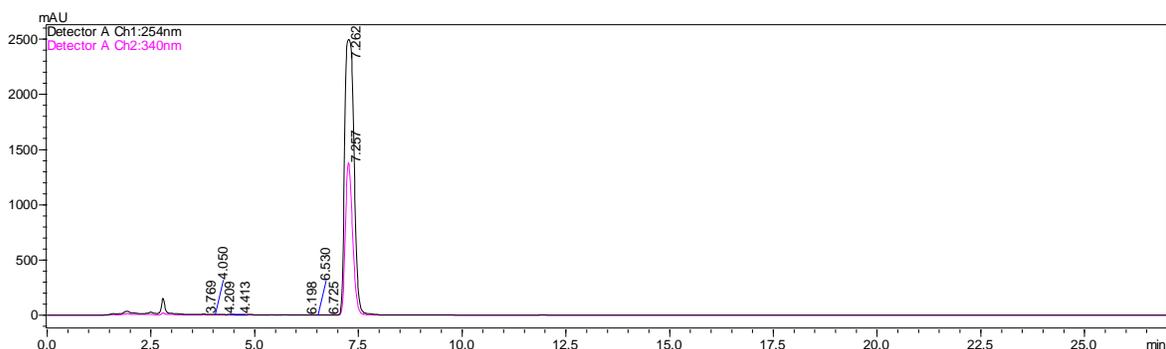
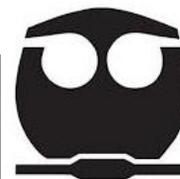


Figura 4.4. Cromatograma generado por la α -mangostina después de someterla a una hidrólisis básica.

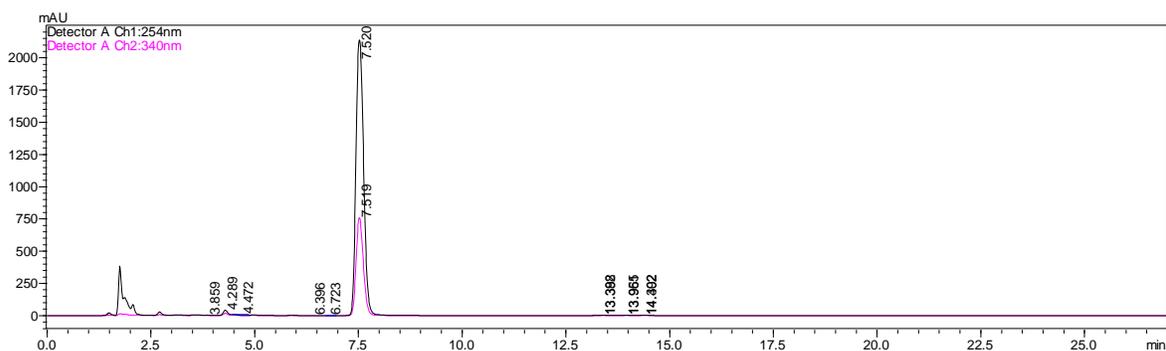
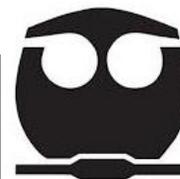


Figura 4.5. Cromatograma generado por la α -mangostina después de someterla a una oxidación.

✦ 4.3.1.3 Precisión

La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre las mediciones obtenidas por múltiples muestreos de una muestra homogénea bajo las condiciones prescritas. La precisión puede evaluarse en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (ICH, 2005). A continuación, se resumen los resultados obtenidos para este parámetro de calidad.



▲ 4.3.1.3.1 Precisión del sistema

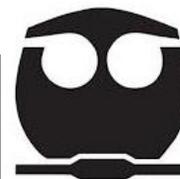
La precisión del sistema, es el grado de concordancia relativa en la respuesta analítica de soluciones de referencia de concentración o magnitud conocida (FEUM, 2011). La precisión del sistema se evaluó mediante el análisis de seis soluciones (50 µg/mL) preparadas por dilución a partir del producto natural utilizado como referencia. En todos los casos la respuesta analítica registrada fue el área bajo la curva. Los resultados obtenidos y su análisis estadístico se resumen en el Cuadro 4.5. Como se deduce de la información presentada el valor del CV es menor a 1.5% por lo tanto, el sistema es preciso.

α-mangostina	
No. de análisis	Área bajo la Curva
1	2153691
2	2153752
3	2153239
4	2151663
5	2151170
6	2151340
Ȳ	2152475.8
s	1211.9
CV	0.1

Cuadro 4.5. Datos obtenidos para evaluar la precisión del sistema.

▲ 4.3.1.3.2 Precisión del método

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico bajo las mismas condiciones analíticas (repetibilidad), o bajo diferentes condiciones analíticas (reproducibilidad), utilizando una muestra homogénea. La precisión de un método analítico generalmente se expresa como la desviación estándar relativa o como el coeficiente de variación (FEUM, 2011).



Este parámetro de calidad se evaluó analizando, por triplicado, la misma matriz de trabajo mediante la aplicación del método desarrollado. Los resultados obtenidos se resumen en el Cuadro 4.6. Como se deduce de esta información el método analítico propuesto es repetible ya que, la variación durante la rutina de trabajo es inferior al 2.0%.

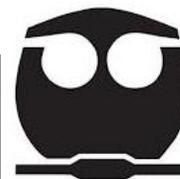
α -mangostina		
Muestra	Concentración del extracto metanólico (matriz de trabajo en $\mu\text{g/mL}$)	Área bajo la Curva
1	54.4	2127361
2	54.4	2124312
3	54.4	2126702
4	54.4	2115204
5	54.4	2130308
6	54.4	2141687
Ȳ		2127595.7
s		8615.2
CV		0.4

Cuadro 4.6. Datos obtenidos para evaluar la repetibilidad del método.

▲ 4.3.1.3.3 Precisión intermedia

La precisión intermedia expresa la variación dentro de un mismo laboratorio cuando el método analítico se aplica en diferentes días y con diferentes analistas (ICH, 2005).

La reproducibilidad del método se evaluó mediante el análisis por triplicado de la matriz de trabajo a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ en dos diferentes días y por dos diferentes analistas. El análisis de los datos obtenidos se resume en el Cuadro 4.7. Los valores del coeficiente de variación total indican que el método analítico desarrollado es reproducible. Con base en estas evidencias se concluye que el método analítico propuesto para cuantificar α -mangostina en la matriz de trabajo es preciso.



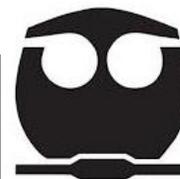
Día	Área bajo la Curva de la α -mangostina	
	Analista	
1	1	2
	2065635	2087944
	2066840	2080927
	2060542	2079422
2	2053738	2029649
	2051236	2029102
	2069307	2026844
Ȳ	2061216.333	2055648
s	7383.7158	29858.2353
CV individual	0.4	1.5
CV ambos	1.0	

Cuadro 4.7. Análisis estadístico de los datos para evaluar la reproducibilidad del método.

✦ 4.3.1.4 Linealidad

La linealidad de un sistema es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito se ajustan a un modelo matemático en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica (FEUM, 2011).

El rango de concentraciones para la α -mangostina se estableció mediante el cálculo aproximado de la concentración en la matriz de trabajo; este valor fue asignado como la concentración al 100%. El cálculo se realizó mediante sucesivas inyecciones de soluciones de concentración conocida del estándar y del extracto metanólico derivado del pericarpio de *G. mangostana*. Una vez establecida esta concentración denominada como 100%, el intervalo de concentraciones se implantó en un rango desde el 25% hasta el 200% debido a la diversidad de preparados que existen en el mercado de productos que contienen mangostán entre sus componentes.

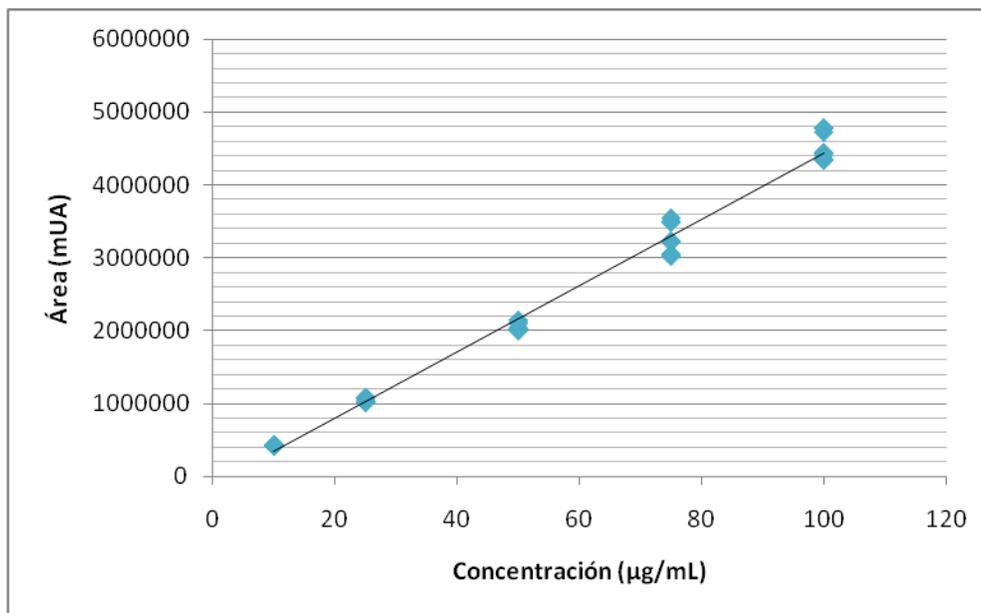


4.3.1.4.1 Linealidad del sistema

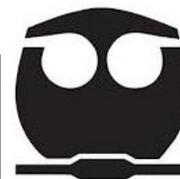
La linealidad del sistema se evaluó mediante el análisis, por triplicado, de un intervalo con cinco niveles de concentración del analito. Los resultados obtenidos para la respuesta analítica se resumen en el Cuadro 4.8. El análisis estadístico de los datos mediante un modelo de regresión lineal permitió estimar el siguiente modelo:

$$\text{Área} = 45414.7786 \cdot \text{Concentración} - 103819.778$$

Para definir la calidad del ajuste al modelo se calcularon los coeficientes de correlación y de determinación. Como se observa en el Cuadro 4.8 el coeficiente de correlación es de 0.9955 por lo que existe una fuerte relación lineal entre las variables (Gráfica 4.1). Por otra parte, el valor del coeficiente de determinación (r^2) permite inferir que el 99.1% de los datos se encuentran explicados por el modelo propuesto. Por último, en el Cuadro 4.9 se observa que con un nivel de confianza del 95% el intervalo calculado para la ordenada al origen incluye el cero mientras que el intervalo para la pendiente no lo contiene. Con base en estas evidencias se concluye que el sistema es lineal en el rango de concentraciones establecido.



Gráfica 4.1. Linealidad del sistema



Estadísticas de la regresión lineal	
Ordenada al origen (β_0)	-103819.778
Pendiente de la recta (β_1)	45414.7786
Coefficiente de correlación (r)	0.9955
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9907

Cuadro 4.8. Parámetros estadísticos de la regresión lineal del sistema.

	Coefficientes	Límite inferior	Límite superior
Ordenada al origen (β_0)	-103819.778	-185729.291	-21910.2647
Pendiente de la recta (β_1)	45414.7786	44080.7546	46748.8027

Cuadro 4.9. Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo de linealidad del sistema.

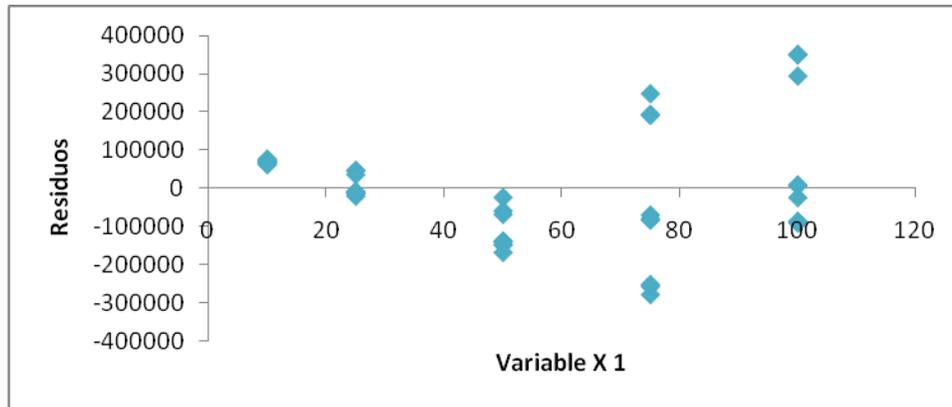
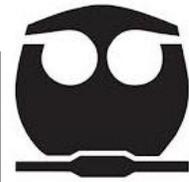
Para confirmar si los datos se ajustan al modelo propuesto se realizó un análisis de varianza (Cuadro 4.10). Para ello, se plantearon las siguientes hipótesis:

H_0 : el modelo estadístico no describe una relación lineal.

H_1 : el modelo estadístico describe una regresión lineal.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F calculada	F crítica
Regresión	1	9.8938×10^{13}	9.8938×10^{13}	4713.53017	1.388×10^{-45}
Residuos	43	9.0258×10^{11}	2.099×10^{10}		
Total	44	9.9841×10^{13}			

Cuadro 4.10. Análisis de varianza de la regresión lineal del sistema.



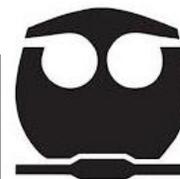
Gráfica 4.2. Gráfica de residuos para el modelo de linealidad del sistema

De acuerdo con las hipótesis planteadas y la Gráfica 4.2 se puede deducir que el modelo de regresión lineal es adecuado para la aplicación que se pretende. Con base en la información presentada por el análisis estadístico total se concluye que el sistema es lineal para la cuantificación de la α -mangostina dentro del intervalo de trabajo.

▲ 4.3.1.4.2 Linealidad del método

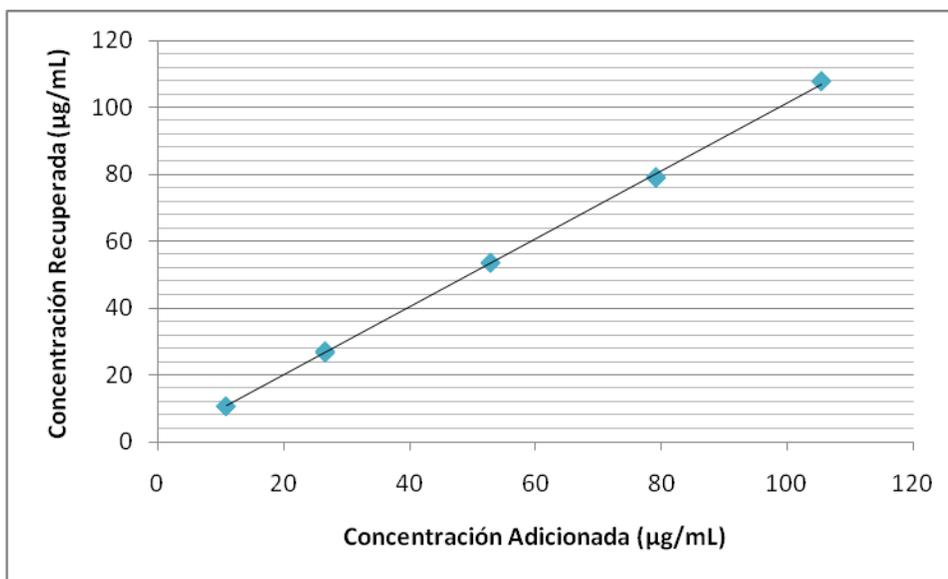
Para llevar a cabo la evaluación de este parámetro se construyó una curva con la concentración adicionada y la concentración recuperada. Como se observa en la Gráfica 4.3 los resultados siguen una tendencia lineal (Cuadro 4.12). Los datos obtenidos permitieron a través, de un análisis estadístico, obtener la siguiente ecuación para el analito de interés:

$$\text{Concentración recuperada} = 1.01796765 * \text{Concentración adicionada} - 0.39790334$$

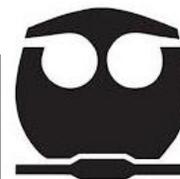


Nivel	Área	Concentración Recuperada (µg/mL)	Concentración Adicionada (µg/mL)
1	425222	10.77	10.94
	426004	10.79	10.94
	427183	10.82	10.94
2	990461	27.08	26.69
	998854	27.31	26.69
	977475	26.72	26.69
3	2127361	53.62	52.94
	2124312	53.54	52.94
	2126702	53.60	52.94
4	3292667	78.90	79.19
	3291263	78.86	79.19
	3307435	79.25	79.19
5	4259133	107.79	105.44
	4251650	107.60	105.44
	4257189	107.74	105.44

Cuadro 4.11. Datos obtenidos para evaluar la linealidad del método.



Gráfica 4.3. Linealidad del método.



Estadísticas de la regresión lineal	
Ordenada al origen (β_0)	-0.3979
Pendiente de la recta (β_1)	1.0179
Coefficiente de correlación (r)	0.9998
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9996

Cuadro 4.12. Parámetros estadísticos de la regresión lineal del método.

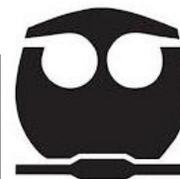
	Coefficientes	Límite inferior	Límite superior
Ordenada al origen (β_0)	-0.3979	-1.1581	0.3623
Pendiente de la recta (β_1)	1.0179	1.0062	1.0296

Cuadro 4.13. Intervalo de confianza al 95% de la ordenada al origen y la pendiente del modelo de linealidad del método.

De nueva cuenta, el análisis estadístico del método permitió realizar las siguientes conclusiones: el coeficiente de correlación es mayor al 0.999, mientras que el coeficiente de determinación se encuentra por encima del valor de 0.98 (Cuadro 4.12). Los intervalos de confianza para la ordenada al origen incluyen el cero mientras que la pendiente incluye la unidad (Cuadro 4.13).

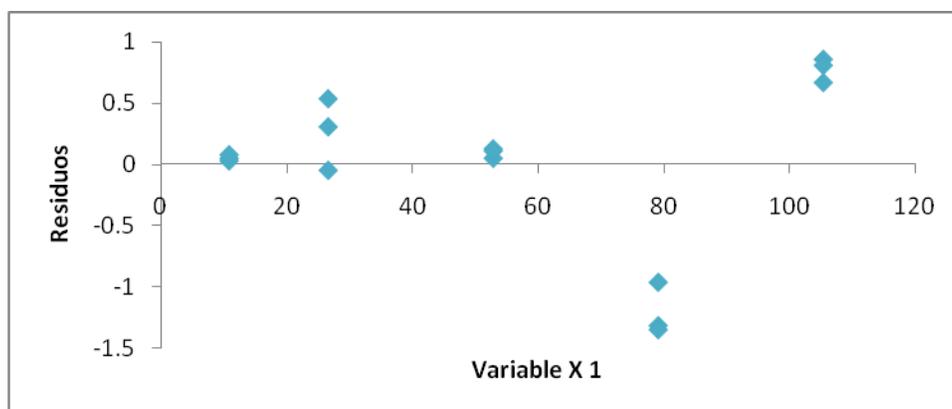
El análisis de varianza para la regresión lineal, establece que el valor calculado para F supera su valor crítico confirmando, de esta manera, que el modelo es adecuado (Cuadro 4.14).

Por último, los puntos que se encuentran en la Gráfica 4.4 no siguen una tendencia por lo tanto, se concluye que el modelo calculado es adecuado para su aplicación.



ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F calculada	F crítica
Regresión	1	18268.1689	18268.1689	35184.0895	1.0593E-23
Residuos	13	6.7498	0.5192		
Total	14	18274.9187			

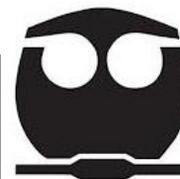
Cuadro 4.14. Análisis de varianza de la regresión lineal del método.



Gráfica 4.4. Gráfica de residuos para el modelo de linealidad del método

✦ 4.3.1.5 Exactitud

La exactitud se define como la concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia (García *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método desarrollado se encuentran resumidos en el Cuadro 4.15.



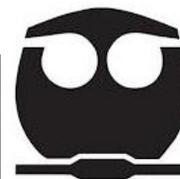
Nivel	Concentración Recuperada (µg/mL)	Concentración Adicionada	% Recobro	Ȳ %Recobro	s	DER (%)
1	10.77	10.94	98.45	98.7	0.2285	0.2
	10.79	10.94	98.63			
	10.82	10.94	98.91			
2	27.08	26.69	101.46	101.3	1.1034	1.1
	27.31	26.69	102.32			
	26.72	26.69	100.13			
3	53.62	52.94	101.29	101.2	0.0763	0.1
	53.54	52.94	101.14			
	53.60	52.94	101.26			
4	78.90	79.19	99.63	99.8	0.2717	0.3
	78.86	79.19	99.59			
	79.25	79.19	100.08			
5	107.79	105.44	102.23	102.2	0.0932	0.1
	107.60	105.44	102.05			
	107.74	105.44	102.19			

Cuadro 4.15. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método.

De acuerdo con los lineamientos establecidos en las guías de validación Q2A y Q2B emitidos por la International Conference on Harmonisation (ICH), el porcentaje de recobro para métodos cromatográficos establece un intervalo del 98.0-102.2%. Como se observa en el Cuadro 4.15 los resultados que se obtuvieron para cada nivel se encuentran dentro del intervalo mencionado. Asimismo, la desviación estándar relativa es menor del 2.0% para cada nivel. Por lo tanto, el método analítico es exacto.

✦ 4.3.1.6 Robustez

Es la capacidad de un método analítico para mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero, deliberadas en sus parámetros normales de operación (García *et al.*, 2002). En métodos cromatográficos, las variaciones típicas que se evalúan para este parámetro de desempeño son: el pH de la fase móvil, la composición de la fase móvil, el uso de diferentes columnas cromatográficas, la temperatura y el flujo, entre otras (ICH, 1996).

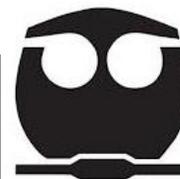


Para evaluar la robustez del método se empleó un diseño factorial 2^3 donde los factores seleccionados fueron el flujo (factor A), la proporción de disolventes en la fase móvil (factor B) y el volumen de inyección (factor C).

Los resultados que se obtuvieron para evaluar la robustez del método se encuentran resumidos en el Cuadro 4.16 y en las Figuras 4.6-4.13. En el Cuadro 4.16 se enlistan los valores de la resolución obtenida para la señal del flavonoide en las diferentes condiciones de análisis. Cabe señalar que para cada experimento se trabajaron 2 réplicas. Para calcular el modelo factorial se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV. Los coeficientes calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar el siguiente modelo factorial:

$$\text{Resolución} = 5.73 - 2.14 * \text{Flujo} - 0.37 * \text{Proporción ACN en fase móvil} - 2.14 * \text{Volumen de Inyección} + 0.07 * \text{Proporción ACN en fase móvil} * \text{Flujo} + 5.73 * \text{Flujo} * \text{Volumen de inyección} + 0.07 * \text{Proporción ACN en fase móvil} * \text{Volumen de Inyección} - 0.37 * \text{Proporción ACN en fase móvil} * \text{Flujo} * \text{Volumen de Inyección}$$

De acuerdo con el modelo calculado los factores seleccionados no producen un incremento en la resolución de la señal para la α -mangostina. En contraste, los efectos de las interacciones AB, BC y AC presentan una contribución positiva en la resolución de las señales. Sin embargo, en la Gráfica 4.5 se observa que sus efectos no son significativos. Por otro lado, el análisis de varianza del modelo (Cuadro 4.17) permitió concluir que sólo los efectos de los factores A y B son significativos ya que sus valores de P son menores a 0.05. En este sentido, el valor de r^2 ajustada indica que el 99.2 % de la variabilidad total se encuentra explicada por el modelo propuesto. Con respecto a la Gráfica de contornos de superficie (Gráfica 4.6) se observa que la mayor resolución se obtiene disminuyendo la proporción de acetonitrilo en la fase móvil y el flujo.



Con base en estas evidencias se deduce que la resolución de la señal para la α -mangostina depende de la composición de la fase móvil y el flujo. En todos los casos la resolución fue mayor a 2 por lo tanto, el método propuesto es robusto.

Bloque	Factores			Respuesta
	Composición de ACN (%)	Flujo (mL/min)	Volumen de inyección (μ L)	Resolución
1	70	0.5	5	8.7
1	70	0.5	20	8.7
1	70	1.5	5	7.4
1	70	1.5	20	7.4
1	90	0.5	5	4.0
1	90	0.5	20	3.8
1	90	1.5	5	3.8
1	90	1.5	20	2.9
2	70	0.5	5	8.5
2	70	0.5	20	8.4
2	70	1.5	5	7.4
2	70	1.5	20	7.5
2	90	0.5	5	4.0
2	90	0.5	20	3.8
2	90	1.5	5	3.0
2	90	1.5	20	2.5

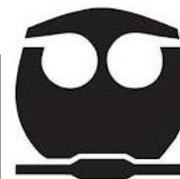
Cuadro 4.16. Resultados obtenidos para evaluar la robustez del método.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Flujo	82.2649	1	82.2649	1158.48	0.0000
B:Proporción de ACN	3.9601	1	3.9601	55.77	0.0000
C:Vol Inyección	0.2304	1	0.2304	3.24	0.1052
AB	0.0729	1	0.0729	1.03	0.3374
AC	0.1764	1	0.1764	2.48	0.1495
BC	0.0841	1	0.0841	1.18	0.3048
Error total	0.6391	9	0.0710111		
Total (corr.)	87.4279	15			

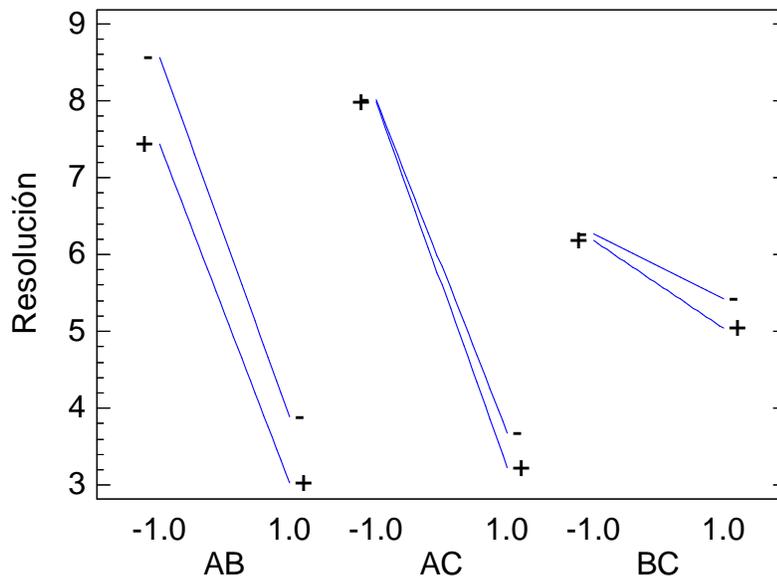
$r^2 = 99.269\%$

r^2 (ajustada por g.l.) = 98.7817%

Cuadro 4.17. Análisis de varianza para del modelo factorial.

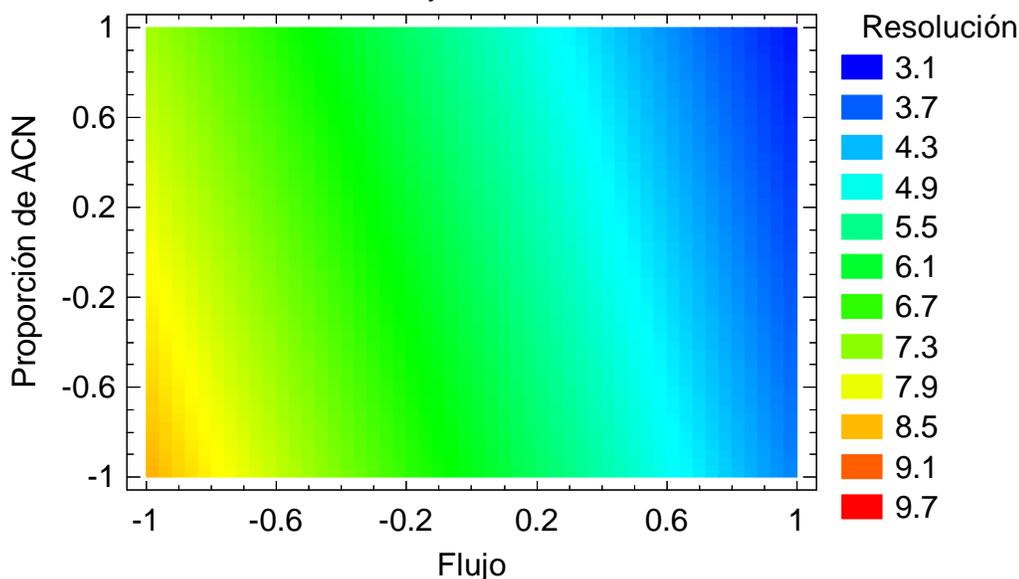


Gráfica de Interacción para Resolución



Gráfica 4.5. Gráfica de interacciones entre los factores

Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada
Vol Inyección=0.0



Gráfica 4.6. Gráfica de contornos de la superficie de respuesta estimada fijando el volumen de inyección a 0.0 μL (Factor C).

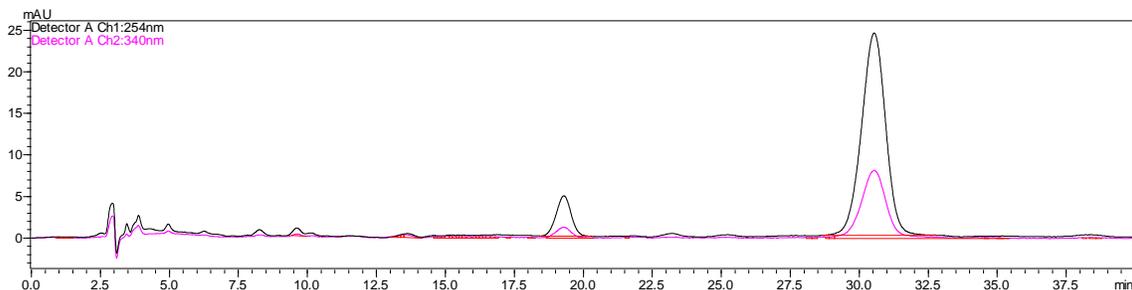
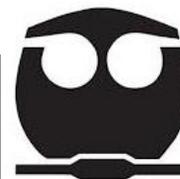


Figura 4.6. Cromatograma obtenido con una proporción de fase 70:30 ACN:H₂O-TFA, flujo de 0.5 mL/min y volumen de inyección 5 µL.

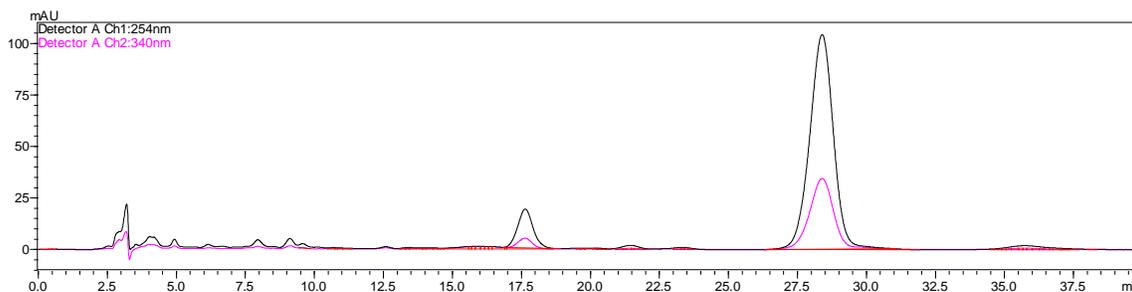


Figura 4.7. Cromatograma obtenido con una proporción de fase 70:30 ACN:H₂O-TFA, flujo de 0.5 mL/min y volumen de inyección 20 µL.

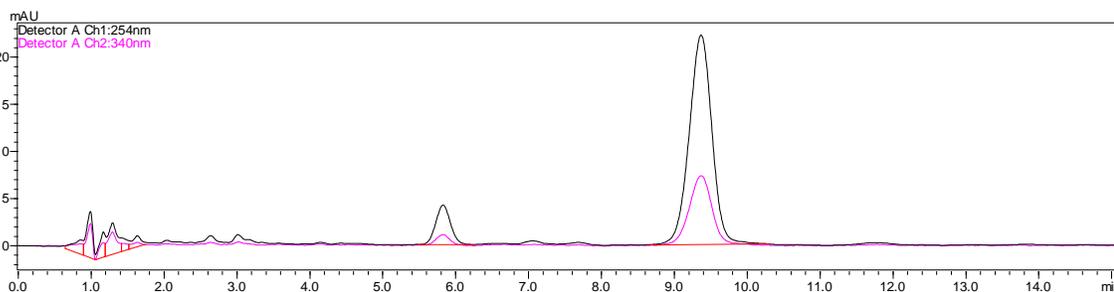


Figura 4.8. Cromatograma obtenido con una proporción de fase 70:30 ACN:H₂O-TFA, flujo de 1.5 mL/min y volumen de inyección 5 µL.

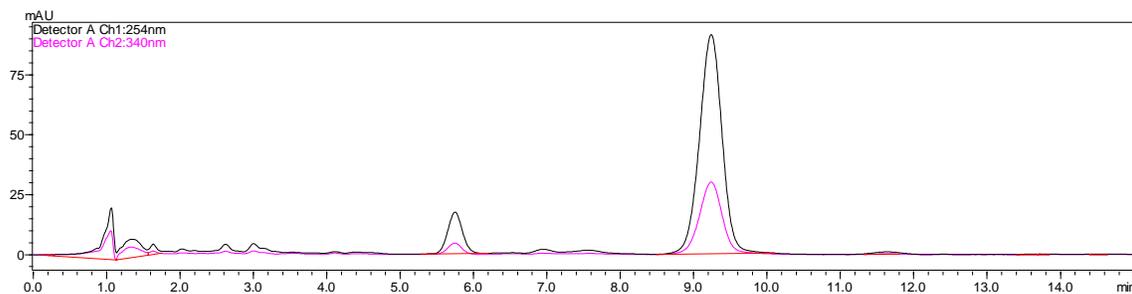
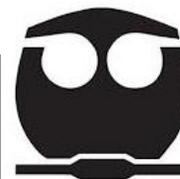


Figura 4.9. Cromatograma obtenido con una proporción de fase 70:30 ACN:H₂O-TFA, flujo de 1.5 mL/min y volumen de inyección 20 μ L.

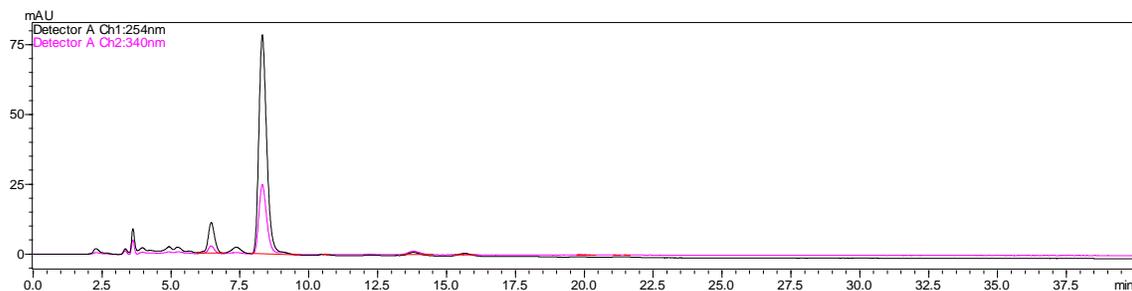


Figura 4.10. Cromatograma obtenido con una proporción de fase 90:10 ACN:H₂O-TFA, flujo de 0.5 mL/min y volumen de inyección 5 μ L.

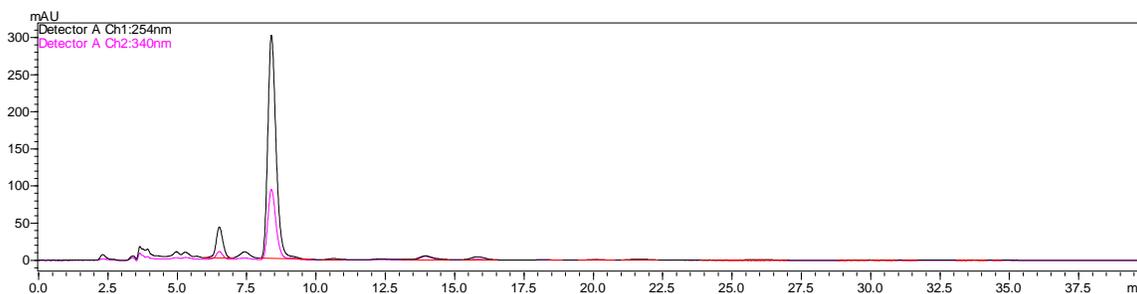


Figura 4.11. Cromatograma obtenido con una proporción de fase 90:10 ACN:H₂O-TFA, flujo de 0.5 mL/min y volumen de inyección 20 μ L.

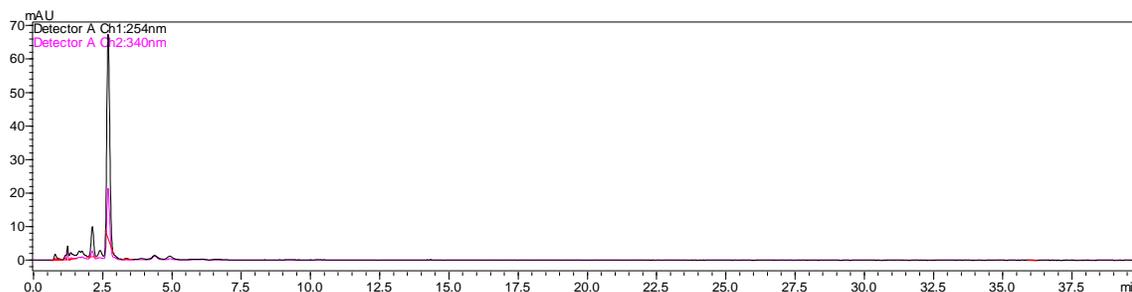
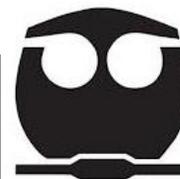


Figura 4.12. Cromatograma obtenido con una proporción de fase 90:10 ACN:H₂O-TFA, flujo de 1.5 mL/min y volumen de inyección 5 μ L.

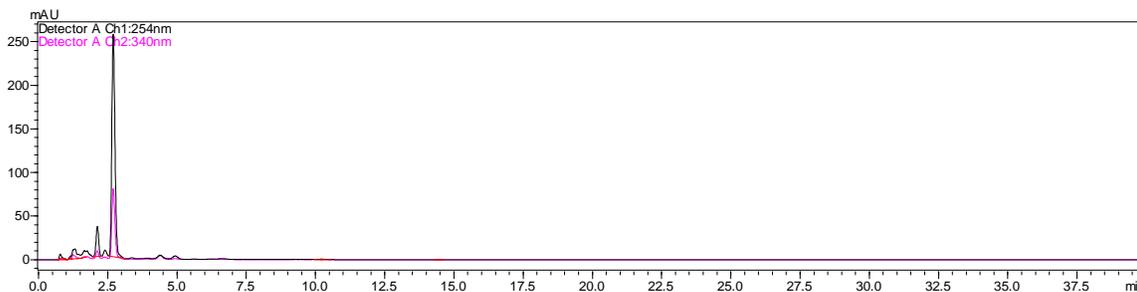
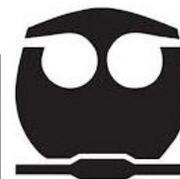


Figura 4.13. Cromatograma obtenido con una proporción de fase 90:10 ACN:H₂O-TFA, flujo de 1.5 mL/min y volumen de inyección 20 μ L.

4.4 Estabilidad de la α -mangostina

Es la propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas (García *et al.*, 2002).

La NOM-073-SSA1-2005 “Estabilidad de fármacos y medicamentos” define a los estudios de estabilidad acelerada como los estudios diseñados bajo condiciones exageradas de almacenamiento para incrementar la degradación química, biológica o los cambios físicos de un fármaco o compuesto. Esta norma establece que para evaluar la estabilidad acelerada de un fármaco nuevo, las condiciones de almacenamiento de los compuestos son 40 ± 2 °C y $75 \pm 5\%$ de temperatura y humedad, respectivamente, en un período de 3



y 6 meses. Sin embargo, debido a la demanda de tiempo, los compuestos se analizaron a los 1, 2 y 3 meses de almacenamiento, el cual es el periodo establecido para fármacos conocidos. Para demostrar la estabilidad de la xantona las muestras se sometieron a un estudio de estabilidad acelerada a una temperatura de 40°C y una humedad de 70%. De manera general, las muestras son estables cuando se verifica la ausencia de señales derivadas de productos de degradación después de someterse a las condiciones de ensayo.

En las siguientes Figuras 4.14-4.16 se observan los cromatogramas obtenidos de las soluciones de las muestras después de cumplir con el tiempo establecido de almacenamiento. Como se observa en dichas Figuras el pico obtenido corresponde a la señal del analito de interés. No hay señales correspondientes a productos de degradación del flavonoide.

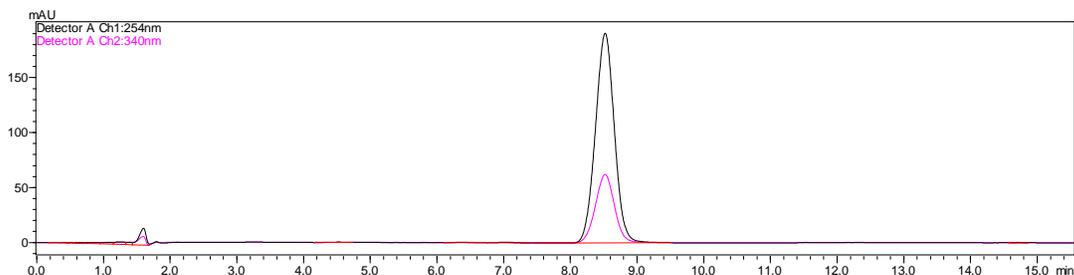


Figura 4.14. Cromatograma generado por la α -mangostina después de 1 mes de almacenamiento a 40°C y 70% de humedad.

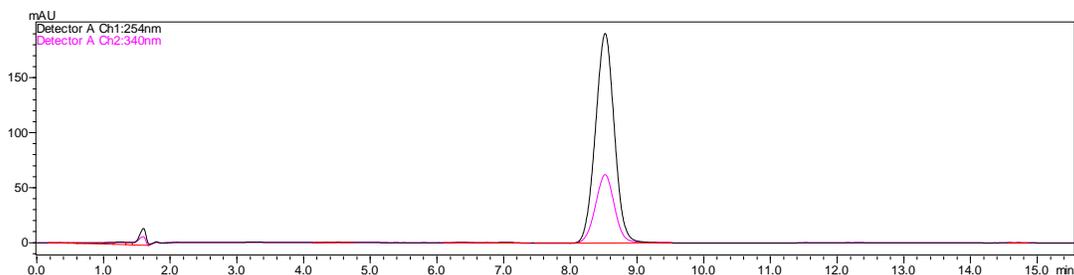


Figura 4.15. Cromatograma generado por la α -mangostina después de 2 meses de almacenamiento a 40°C y 70% de humedad.

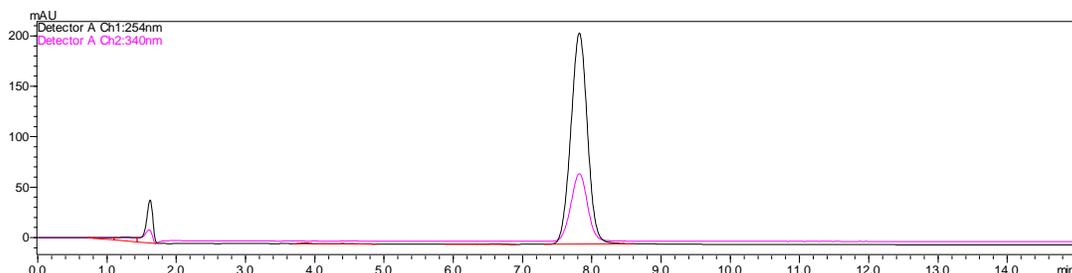
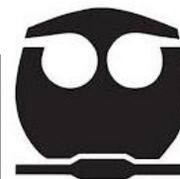
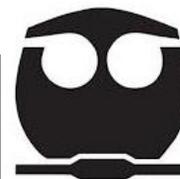


Figura 4.16. Cromatograma generado por la α -mangostina después de 3 meses de almacenamiento a 40°C y 70% de humedad.

De acuerdo con la NOM-073-SSA1-2005, se considera como cambio significativo, cualquier variación del 5 por ciento en su concentración original, cambios en su apariencia y en sus propiedades físicas del medicamento. Después de llevar a cabo el análisis de las muestras, no se observó ningún cambio en su apariencia física, ya que seguía siendo polvo amarillo; característico de la α -mangostina. En lo que respecta a la degradación de las muestras se observa que en el transcurso de los meses el porcentaje aumenta, lo que indica que la muestra se degrada poco a poco (Cuadro 4.18).

Tiempo de almacenamiento	% de degradación de la α -mangostina
Mes 1	91.8
Mes 2	89.9
Mes 3	85.4

Cuadro 4.18. % de degradación de la α -mangostina. Estabilidad.



4.5 Análisis de los diferentes preparados que contienen α -mangostina

En primer lugar, se identificó el marcador químico en cada uno de los suplementos alimenticios adquiridos comercialmente. Una vez que se identificó y corroboró la señal de la α -mangostina con la señal generada por el estándar (Figura 4.17) se llevó a cabo, el análisis de las muestras bajo las condiciones cromatográficas con las cuales se realizó la validación del método (Figuras 4.18-4.21).

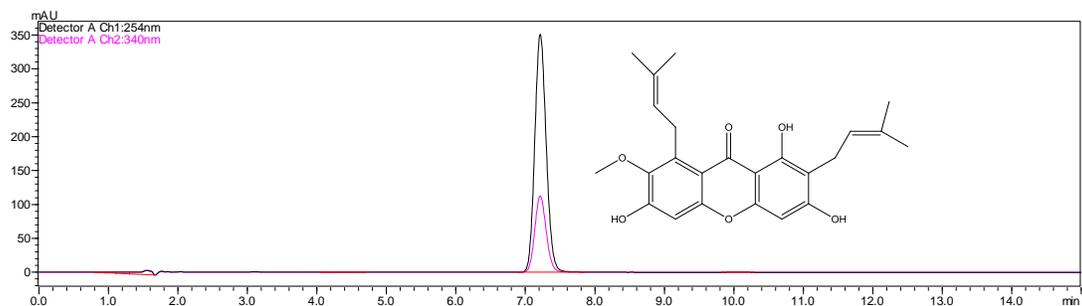


Figura 4.17. Cromatograma generado con el estándar de α -mangostina.

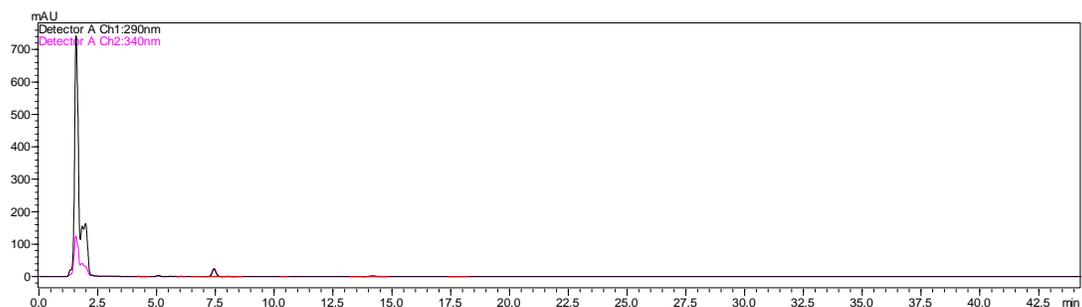


Figura 4.18. Cromatograma obtenido con el suplemento alimenticio #1.

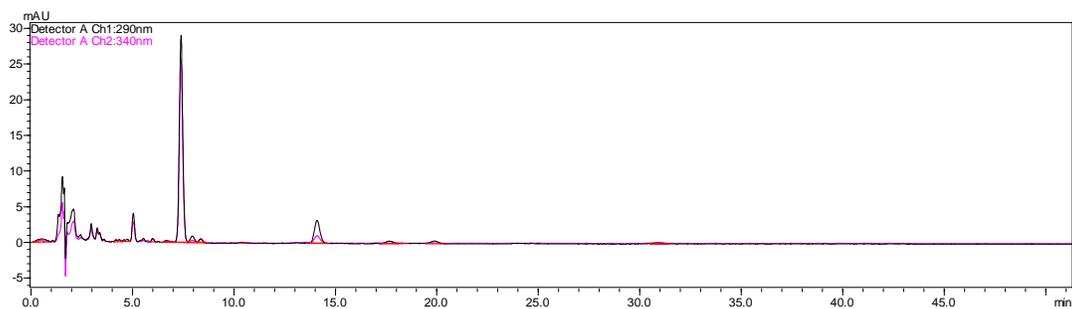
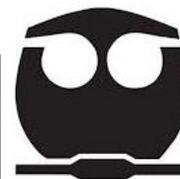


Figura 4.19. Cromatograma obtenido con el suplemento alimenticio #2.

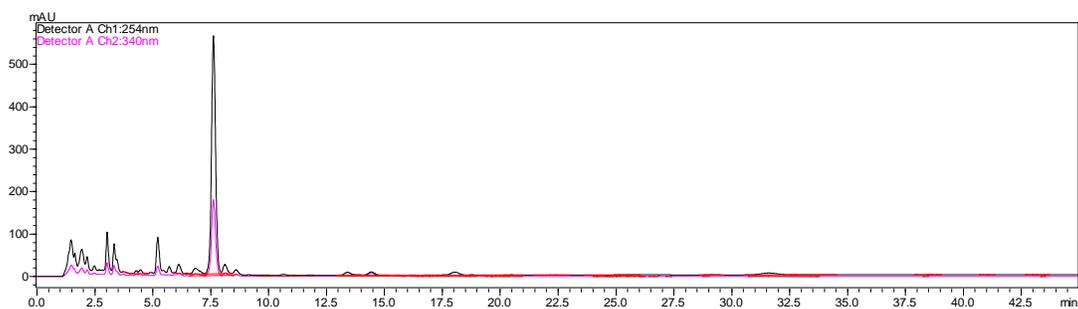


Figura 4.20. Cromatograma obtenido con el suplemento alimenticio #3.

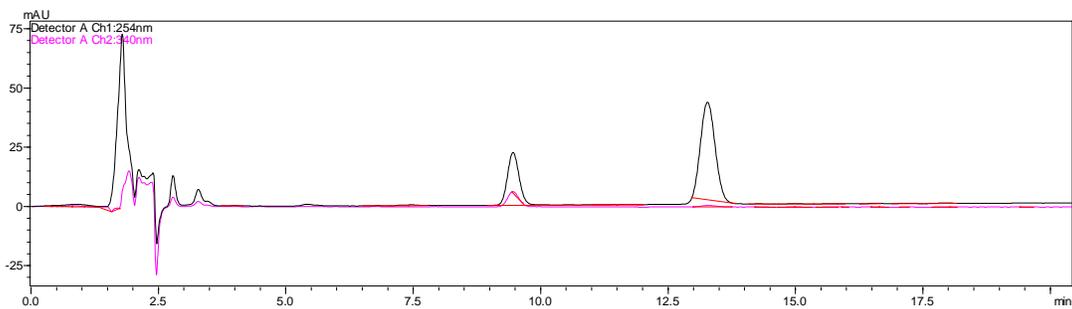
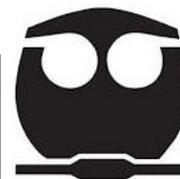


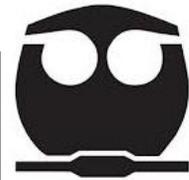
Figura 4.21. Cromatograma obtenido con el suplemento alimenticio #4.



Producto	Nombre del Laboratorio y lugar de elaboración	¹ Información declarada en el marbete (mg)	mg de α -mangostina/cápsula	Contenido promedio (mg)
Suplemento alimenticio #1	Lab. Solanum Nuevo León	Extracto de fruto Mangosteen 100	4.3987 \pm 0.1493	413.82
Suplemento alimenticio #2	Lab. Natural BainFood. Zapopan, Jalisco	Concentrado frutal 300	5.5324 \pm 0.1634	424.7
Suplemento alimenticio #3	Lab. Tecnobotánica de México. México, DF.	----	89.5482 \pm 1.4930	509.1
Suplemento alimenticio #4	Lab. Algarín S.A México, D.F.	50	0.4507 \pm 0.0254	834.8

Cuadro 4.19. Contenido de α -mangostina y especificaciones en la etiqueta de los suplementos alimenticios analizados.

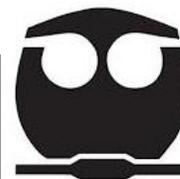
¹ ver figura 4.22



a) #1



b) #2

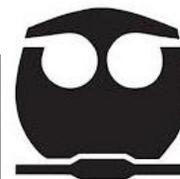


c) #3



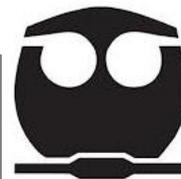
d) #4

Figura 4.22. Suplementos alimenticios analizados, en donde se muestra que el marbete no está indicado correctamente.



Como se observa en las Figuras 4.18-4.21 todos los productos analizados con la metodología desarrollada y validada presentan la señal correspondiente a la α -mangostina. Cabe señalar que a pesar de los diversos niveles de calidad entre los productos ninguna de las señales adicionales presenta interferencia con la atribuida a la α -mangostina. Como era de esperarse, la cantidad del marcador varía drásticamente dependiendo de la marca del producto, es decir, varía desde 0.45 mg hasta 89.54 mg del marcador. El producto que presenta el mayor contenido de α -mangostina es suplemento alimenticio #3, sin embargo, dicho producto no indica una concentración definida en su marbete (Cuadro 4.19). El mismo comportamiento sucede con los demás productos analizados. De este modo, no fue posible hacer una relación entre la cantidad obtenida y la teórica.

En síntesis, el análisis de los suplementos alimenticios es un reto difícil de abordar ya que los mismos representan una matriz multicomponente, y no se indica el origen y una concentración definida del extracto del fruto empleado para la elaboración de dichos productos. En este sentido, la cuantificación de principios activos en estos preparados es de vital importancia ya que la eficacia terapéutica de los mismos depende de su concentración. Aún más, es difícil establecer la dosis recomendada debido a que no existen pautas por parte de la Secretaría de Salud para la ingesta diaria de antioxidantes adicionales a la dieta normal. En este sentido, la Ley General de Salud establece que la dosis diaria de vitamina C se encuentra entre 70 y 90 mg al día (100 mg al día para fumadores). Sin embargo, algunos expertos recomiendan una ingesta de 200 a 500 mg al día para saturación de los tejidos corporales y obtención de un beneficio óptimo. Se piensa que dosis superiores a 500 mg al día no ofrecen un beneficio añadido y pueden ser peligrosas para los pacientes con cáncer. De esta manera, sería altamente factible que se publicaran las recomendaciones pertinentes para este tipo de productos que escapen de la legislación sanitaria actual.



5. CONCLUSIONES

- a) Se desarrolló un método eficiente para la extracción del marcador químico en los diversos suplementos alimenticios.
- b) El método analítico desarrollado para evaluar el contenido de α -mangostina en el extracto metanólico de *G. mangostana* es lineal, específico y exacto, en el intervalo de concentraciones establecidas.
- c) El análisis de los diversos suplementos alimenticios por HPLC permitió identificar y cuantificar a la α -mangostina como el constituyente primordial de dichos productos.
- d) La selección de α -mangostina como entidad química para el desarrollo y la validación del método analítico por HPLC será de gran utilidad para la estandarización de los suplementos alimenticios. Con esta actividad se podría iniciar con el aseguramiento de la calidad de los productos que contengan α -mangostina.

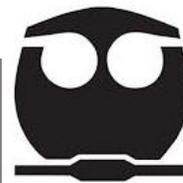


6. PERSPECTIVAS

Aplicar la metodología desarrollada a productos herbolarios o suplementos alimenticios que contengan mangostán entre sus componentes.

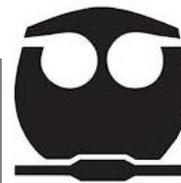
Con base en los resultados derivados del análisis sistemático de productos que contengan mangostán podrían emitirse las recomendaciones especiales a los ministerios de salud en cuanto al desarrollo de los criterios de calidad básicos que permitirá correlacionar la concentración de α -mangostina con una actividad específica.

Además del análisis de los productos herbolarios o suplementos alimenticios que contengan mangostán, sería factible realizar estudios para demostrar la actividad antioxidante de éstos y correlacionarlo con el contenido del marcador químico.

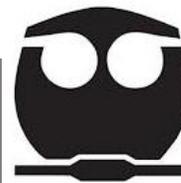


7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

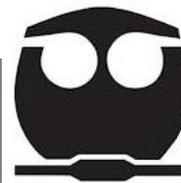
- 1) Alekshun M.N., Levy, S.B. (2006). *Biochem Pharmacol.* **71**:893.
- 2) Asai, F., Iinuma, M., Tanaka, T., Tosa, H. (1995). A xanthone from pericarps of *Garcinia mangostana*. *Phytochem.* **39**: 943–944.
- 3) Balasubramanian, K., Rajagopalan, K. (1988). Novel xanthones from *Garcinia mangostana*, structures of BR-xanthone-A and BR-xanthone-B. *Phytochem.* **27**: 1552–1554.
- 4) Chairungsrilerd, N., Furukawa, K., Ohta, T., Nozoe, S., Ohizumi, Y. (1996c). Histaminergic and serotonergic receptor blocking substances from the medicinal plant *Garcinia mangostana*. *Planta Med.* **62**: 471–472.
- 5) Chairungsrilerd, N., Takeuchi, K., Ohizumi, Y., Nozoe, S., Ohta, T. (1996a). Mangostanol, a prenyl xanthone from *Garcinia mangostana*. *Phytochem.* **43**: 1099–1102.
- 6) Chomnawang, M.T., Sakagami, S.S., Nukoolkarn, V.S., Gritsanapan, W. (2005). Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J. Ethnopharmacol.* **101**: 330–333.
- 7) COFEPRIS
(http://www.cofepris.gob.mx/Documents/LoMasReciente/lista_PM.pdf).
- 8) Dragendorff, O., (1930). Über das Harz von *Garcinia Mangostana* L.. *Liebigs. Ann.* **482**: 280–301.
- 9) Dutta, P., Sem, A., Sarkar, K., Banerji, N. (1987). Acid-catalysed cyclisations of xanthones: structure of a new xanthone from *Garcinia mangostana* Linn. *Indian J. Chem.* **26B**: 281–282.
- 10) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 2011. Comisión Permanente de la Farmacopea. Tomo II. 10° Edición. Secretaría de Salud. México: 2569-2580.
- 11) Garcia, M., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J. y Alcántara, A. (2002). Comisión de Validación de Métodos Analíticos. Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos: 8-11.



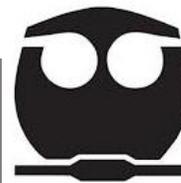
- 12) Gopalakrishnan G, Balaganesan B. (2000). Two novel xanthenes from *Garcinia mangostana*. *Fitoterapia*. **71**(5):607-9.
- 13) Gopalakrishnan G., Banumathi B., Suresh, G. (1997). Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. *J Nat Prod*. **60**(5):519-24.
- 14) Govindachari, T.R.K.P., Muthukumaraswamy, N. (1971). Xanthenes of *Garcinia Mangostana* Linn. *Tetrahedron*. **27**: 3919–3926.
- 15) Ho, C.K., Huang, Y.L., Chen, C.C., (2002). Garcinone E, a xanthone derivative, has potent cytotoxic effect against the hepatocellular carcinoma cell lines. *Planta Med*. **68**: 975–979.
- 16) Huang Y.L., Chen C.C., Chen Y.J., Huang RL., Shieh B.J. (2001). Three xanthenes and a benzophenone from *Garcinia mangostana*. *J Nat Prod*. **64**(7):903-906.
- 17) International Conference on Harmonisation (ICH Harmonised Tripartite Guideline) 1994. *Validation of analytical procedures: Text and Methodology*. Q2A.
- 18) International Conference on Harmonisation (ICH Harmonised Tripartite Guideline) 2005. *Validation of analytical procedures: Text and Methodology*. Q2A y Q2B Q2(R1).
- 19) Jinsart, W., Ternai, B., Buddhasukh, D., Polya, G.M. (1992) .Inhibition of wheat embryo calcium-dependent protein kinase and other kinases by mangostin and γ mangostin. *Phytochem*. **31**: 3711–3713.
- 20) Jung, H.A., Su, B.N., Keller, W.J., Mehta, R.G., Kinghorn, D. (2006). Antioxidant Xanthenes from pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J. Agric. Food. Chem*. **54**: 2077–2082.
- 21) Ley General de Salud, Artículo 207.
- 22) Lih-Geeng C., Ling-Ling Y., Ching-Chiung W. (2008). Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. *Food Chem Toxicol*. **46**: 688–693.
- 23) Likhitwitayawuid, K., Chanmahasathien, W., Ruangrunsi, N., Krungkrai, J. (1998b). Xanthenes with antimalarial activity from *Garcinia dulcis*. *Planta Med*. **64**: 281–282.
- 24) Likhitwitayawuid, K., Phadungcharoen, T., Krungkrai, J. (1998a). Antimalarial xanthenes from *Garcinia cowa*. *Planta Med*. **64**: 70–72.



- 25) Mahabusarakam, W., Wiriyaachtra, P., Taylor, W. (1987). Chemical constituents of *Garcinia mangostana*. *J. Nat. Prod.* **50**: 474–478.
- 26) Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y. (2003). Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukemia cell lines. *J Nat Prod.* **66** (8):1124-1127.
- 27) Matsumoto K, Akao Y, Yi H, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Kobayashi E, Iinuma M, Nozawa Y. (2004). Preferential target is mitochondria in alpha-mangostin-induced apoptosis in human leukemia HL60 cells. *Bioorg Med Chem.* **12**(22): 5799-806.
- 28) Matsumoto, K., Akao, Y., Kobayashi, E., Ohguchi, K., Ito, T., Iinuma, M., Nozawa, Y. (2003). Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukemia cell lines. *J. Nat. Prod.* **66**: 1124–1127.
- 29) Mendoza Patiño Nicandro. Farmacología médica. Editorial Medica Panamericana. 1° edición. 2008. Pp 922.
- 30) Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005. Estabilidad de Medicamentos.
- 31) Pedraza-Chaverri, J., Cardenas-Rodriguez, N., Orozco-Ibarra, M., Perez-Rojas, J.M. (2008). Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food Chem. Toxicol.* **46**: 3227–3239.
- 32) Sakai, S., Katsura, M., Takayama, H., Aimi, N., Chokethaworn, N., Suttajit, M., (1939). The structure of garcinone E. *Chem. Pharm. Bull.* **41**: 958–960.
- 33) Shankaranarayan, D., Gopalakrishnan, C. And Kameswaran, L. (1979). Pharmacological profile of mangostin and its derivatives. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie.* **239**: 257-269.
- 34) Schmid, W. (1855). Ueber das mangostin. *Liebigs. Ann. Chem.* **93**: 83–89.
- 35) Sen, A.K., Sarkar, K.K., Majumder, P.C., Banerji, N. (1980a). Isolation of three new minor xanthenes from *Garcinia mangostana* Linn. *Indian J. Chem.* **19B**: 1008.
- 36) Sen, A.K., Sarkar, K.K., Majumder, P.C., Banerji, N. (1986). Garcinone-D, a new xanthone from *Garcinia mangostana* Linn. *Indian J. Chem.* **25B**: 1157–1158.
- 37) Sen, A.K., Uusvuori, R., Hase, T.A., Banerji, N., Sarkar, K.K., Mazumder, P.C. (1982). The structures of garcinones A, B and C: three new xanthenes from *Garcinia mangostana*. *Phytochem.* **21**: 1747–1750.
- 38) Sen, A.K., Uusvuori, R., Hase, T.A., Banerji, N., Sarkar, K.K., Mazumder, P.C. (1980b). A xanthone from *Garcinia mangostana*. *Phytochem.* **19**: 2223–2225.



- 39) Stout, G.H., Krahn, M.M. (1968). The structure of mangostin. *Chem. Commun.*: 211–212.
- 40) Suksamrarn S., Suwannapoch N., Ratananukul P., Aroonlerk N., Suksamrarn A. (2002). Xanthones from the green fruit hulls of *Garcinia mangostana*. *J Nat Prod.* **65**(5):761-763.
- 41) Suksamrarn, S., Suwannapoch, N., Phakhodee, W., Thanuhiranlert, J., Ratananukul, P., Chimnoi, N., Suksamrarn, A. (2003). Antimycobacterial activity of prenylated xanthones from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem. Pharm. Bull.* **51**:857–859.
- 42) Sundaram, B.M., Gopalakrishnan, C., Subramanian, S., Shankaranarayanan, D., Kameswaran, L. (1983). Antimicrobial activities of *Garcinia mangostana*. *Planta Med.* **48**: 59–60.
- 43) Vieira, L.M., Kijjoa, A. (2005). Naturally-occurring xanthones: recent developments. *Curr Med Chem.* **12**(21):2413-46.
- 44) Yates, P., Bhat, H.B. (1968). Structure of b-mangostin. *Can. J. Chem.* **46**, 3770–3772.
- 45) Yates, P., Stout, G.H. (1958). The structure of mangostin. *J. Am. Chem. Soc.* **80**: 1691–1700.
- 46) Young-Won C. and A. Douglas K.A. (2008). Structural Characterization, Biological Effects, and Synthetic Studies on Xanthones from Mangosteen (*Garcinia mangostana*), a Popular Botanical Dietary Supplement. *Mini Rev Org Chem.* **5**(4): 355–364.



APÉNDICE I

★ Factor de capacidad

Para cada pico de un cromatograma se define el factor de capacidad, K' .

Relaciona el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna con las propiedades termodinámicas de la columna y con la temperatura. Para un conjunto dado de parámetros de operación, k' es una medida del tiempo transcurrido en la fase estacionaria en relación con el tiempo transcurrido en la fase móvil (Romero, G. S., 2002). El valor del factor de capacidad (k') tiene un intervalo comprendido entre 2 y 10.

Factor de capacidad:
$$K' = \frac{(t_r - t_m)}{(t_m)}$$

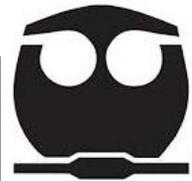
$$k' = \frac{\text{Tiempo de la sustancia en la fase estacionaria}}{\text{Tiempo de la sustancia en la fase móvil}}$$

Cuanto más tiempo permanece un componente en la columna, mayor es su factor de capacidad. Para controlar el funcionamiento de una columna determinada, una buena práctica es medir periódicamente el factor de capacidad de un patrón, el número de platos teóricos y la simetría del pico. Los cambios de estos parámetros reflejan la degradación de la columna (Harris. D.C., 2007).

★ Número de platos teóricos

Cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases. El número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna. Una buena columna tiene un número alto de platos teóricos (Romero, G. S., 2002). Se recomienda un valor de $N > 2000$.

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2 = 5.545 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 = 2\pi \left(\frac{t_r}{\text{Area/Altura}} \right)^2$$

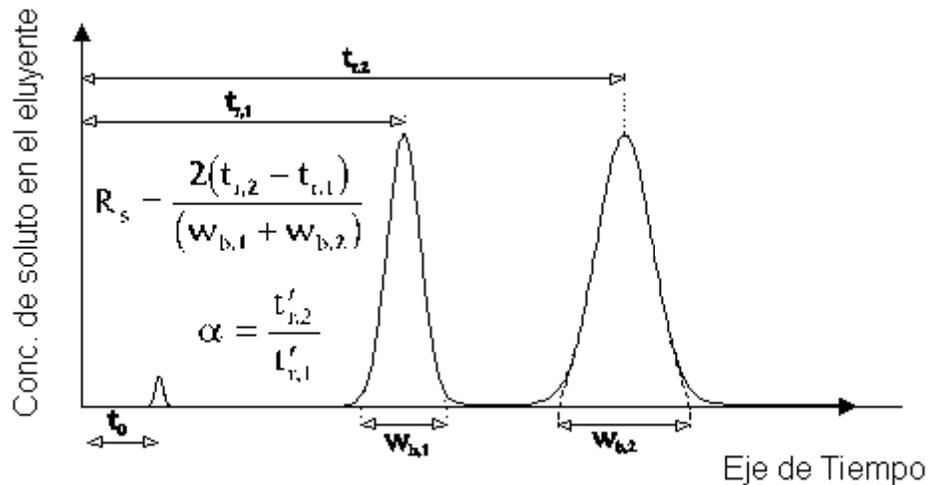


★ Resolución

El grado de separación o resolución de dos bandas adyacentes se define como la distancia entre los picos (o centros) dividida entre el ancho promedio de las bandas. Si la retención y el ancho de la banda se mide en unidades de tiempo, la resolución está dada por:

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{(W_{b1} + W_{b2})}$$

Donde los tiempos de retención (t_r) y los anchos del pico (W_b) se expresan en las mismas unidades (Figura 4.2). La resolución mínima aceptable en mezclas sencillas es de 1.0 y una resolución de 1.5 representa una separación de la base.



★ Factor de coleo

Se define como la relación de la distancia del ancho del pico, $W_{0.05}$, dividido entre dos veces la distancia, f , del pico hacia el lado izquierdo del pico. Estas distancias deben medirse a un punto que corresponda a un 5 por ciento de la altura partiendo de la línea base. Para un pico simétrico el factor de coleo es la unidad y el valor de T aumentada conforme va siendo más pronunciado (FEUM, 2011). Se recomienda un valor de $T < 2$.

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$