



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE RESVERATROL
EN SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS DE VENTA EN EL
DISTRITO FEDERAL**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

IVÁN GUILLERMO DE LA CHICA LÓPEZ

Director de tesis: Dr. Vicente Jesús Hernández Abad

Asesora de tesis: Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez González

México D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado en su totalidad con recursos de la Universidad Nacional Autónoma de México, otorgados a través de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) PE200815 “Mejora de la enseñanza y el aprendizaje de la validación de métodos analíticos mediante el desarrollo e implementación de materiales educativos innovadores”, por lo que se agradece su apoyo.

DEDICATORIAS

A mis padres Rosa María López Martínez y Manuel De la chica Martínez, por darme las bases para ser la persona que ahora soy, por enseñarme que para conseguir nuestras metas hay que trabajar, por darme la oportunidad de terminar mis estudios, por apoyarme y estar para mí todos los días.

A mi hermana Cyntia De la chica López, por preocuparse siempre por mí y mi desarrollo personal y educativo.

A Carlos Eder Montes López, Luis Manuel López, Julio Cesar Melchor y Arturo Levi Rangel, por ser mis hermanos de toda la vida, han estado conmigo en todos los momentos importantes de mi vida y en los difíciles siempre me ayudaron a salir adelante, por ser mis mejores amigos.

A mis amigos Max Núñez, Samantha Contreras, Yassmin Rodríguez, Isaac Díaz, por todos los momentos que hemos pasado juntos, las fiestas, los conciertos, las alitas de ángel y muchos más que aún faltan.

A Karelym Quintana Islas, por todo el apoyo que me brindas, la paciencia, el amor, por acompañarme en esta última etapa de mi carrera y recordarme que no tenía que bajar los brazos.

Al Dr. Vicente J. Hernández Abad, Dra. Elizabeth G. Sánchez y la MASS Cinthia Espinosa por mi formación profesional y sobre todo personal, por todo el apoyo que me brindan y por su amistad.

A todas las personas que me brindaron una palabra de apoyo en esta etapa de mi vida.

CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN	6
2 MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Medicamentos y suplementos alimenticios	7
2.1.1 Atributos de calidad deseables en medicamentos y suplementos alimenticios.....	7
2.1.2 Calidad de suplementos alimenticios.....	8
2.1.3 Regulación de los suplementos alimenticios	9
2.1.4 Relevancia actual de los suplementos alimenticios	11
2.1.5 Resveratrol: propiedades y usos	11
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
4 HIPÓTESIS	15
5 OBJETIVOS	15
6 MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
6.1 Diseño experimental	16
6.2 Materiales	16
6.3 Reactivos	17
6.4 Equipos e instrumentos.....	17
6.5 Selección de los productos.	18
6.6 Determinación de la calidad de productos comercializados en el Distrito Federal que contienen resveratrol.....	18
6.6.1 Cápsulas.....	19
6.6.1.1 Variación de peso y peso promedio	19
6.6.1.2 Contenido promedio de polvo.....	19
6.6.1.3 % de humedad	19
6.6.1.4 Tiempo de desintegración	19
6.6.1.5 Contenido de resveratrol	19
6.6.2 Solución oral.....	20
6.6.2.1 Determinación de pH.....	20
6.6.2.2 Densidad relativa.....	20

6.6.2.3 Contenido de resveratrol	21
6.7 Desarrollo del método de análisis.	22
6.7.1 Determinación de longitud de onda y fase móvil.	22
6.7.2 Prueba del método analítico.	23
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
7.1 Selección de los productos.	26
7.2 Determinación de la fase móvil y longitud de onda.....	28
7.3 Prueba del método analítico.	31
7.4 Determinación de la calidad de productos comercializados en el Distrito Federal que contienen resveratrol.....	34
8 CONCLUSIÓN	38
9 REFERENCIAS.....	39

1 INTRODUCCIÓN

El mercado mundial de los suplementos alimenticios está creciendo más rápido que la mayoría de otros sectores de la industria alimentaria, ya que tienen un papel importante en la cultura que existe entre alimentación y salud. Debido al creciente aumento de los productos que promueven la salud, estos, deben ser cuidadosamente examinados con el fin de evitar fraude y falsas expectativas.

Los suplementos alimenticios se presentan en formas farmacéuticas como: tabletas, cápsulas, soluciones orales, entre otras, que implícitamente sugieren un grado de calidad y eficacia, que también es sugerida a través de declaraciones de diferentes propiedades en sus marbetes y por sus proveedores. De ello se desprende que los consumidores a menudo creen que los suplementos alimenticios tienen propiedades terapéuticas preventivas o rehabilitatorias, sin presentar efectos secundarios y adversos en comparación con los medicamentos. Sin embargo, en muchas ocasiones, parece no haber una garantía de su calidad o inocuidad. Tal es el caso de suplementos tales como aquellos que contienen resveratrol, el cual es un antioxidante natural que se encuentra en las uvas, y del cual se cree que tiene algunas actividades prometedoras en enfermedades relacionadas con el envejecimiento, actualmente se comercializa en productos con formas farmacéuticas.

Debido a que en México los suplementos alimenticios no cuentan con estudios que garanticen el contenido de la sustancia responsable de dichas actividades prometedoras, es importante contar con métodos analíticos que permitan la cuantificación de estas sustancias.

Este trabajo se enfocó a determinar el contenido de resveratrol, mediante un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución diseñado para este fin en productos cuyos fabricantes indican su contenido en el marbete.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Medicamentos y suplementos alimenticios

La Ley General de Salud define a un medicamento como toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas. Por otra parte, el artículo 215, fracción V, de la Ley General de Salud define los suplementos alimenticios como: productos a base de hierbas, extractos vegetales, alimentos tradicionales, deshidratados o concentrados de frutas, adicionados o no, de vitaminas o minerales, que se puedan presentar en forma farmacéutica y cuya finalidad de uso sea incrementar la ingesta dietética total, complementaria o suplir alguno de sus componentes.¹

Los suplementos alimenticios son ampliamente utilizados por una variedad de razones tales como el equilibrio de la dieta, mejorar la apariencia y/o el rendimiento, promover la buena salud y el bienestar, o retrasar la aparición de enfermedades relacionadas con la edad.²

Los suplementos alimenticios no pueden contener únicamente vitaminas y minerales, ya que se consideraría un medicamento vitamínico y no un suplemento; tampoco pueden contener sustancias con acción farmacológica o propiedades terapéuticas, preventivas o rehabilitatorias ya sean naturales o sintéticas, salvo que cumplan con las disposiciones aplicables a los insumos de la salud.³

2.1.1 Atributos de calidad deseables en medicamentos y suplementos alimenticios.

Controlar y minimizar los efectos secundarios, así como evitar los efectos adversos de los medicamentos, es un tema importante para garantizar la seguridad de los pacientes que los consumen, puesto que los efectos secundarios

son inherentes a los diferentes componentes de los que están hechos, la calidad de los excipientes, las formulaciones, así como el proceso de fabricación deben de contar con alto grado de calidad. Los atributos principales de calidad de los medicamentos son la identidad, la potencia y la pureza.⁴

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013 de Buenas prácticas de fabricación de medicamentos define a la calidad como al cumplimiento de especificaciones establecidas para garantizar la aptitud de uso, algunas de estas especificaciones son que los medicamentos sean diseñados y fabricados de acuerdo con los requisitos y estándares de buenas prácticas de fabricación, buenas prácticas de laboratorio y buenas prácticas de documentación, así como se apliquen los controles necesarios en las materias primas, productos intermedios y producto terminado durante la etapa de fabricación.⁵

Los suplementos alimenticios no cuentan con normas que establezcan los estándares de calidad mínimos que deberían de cumplir los fabricantes de estos productos para poder asegurar su calidad, únicamente deben cumplir con la NOM-251-SSA1-2009, que establece los requisitos mínimos de buenas prácticas de higiene que deben observarse en el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.

Debido a lo anterior estos productos no tienen la misma regulación que los medicamentos, esto se abordará a continuación.

2.1.2 Calidad en suplementos alimenticios.

Existen estudios de suplementos deportivos, donde sus principales componentes son péptidos y proteínas de huevo, los cuales no se encuentran en la cantidad indicada en su marbete¹³, los suplementos que pretenden mejorar la actividad sexual y que se refieren a menudo como sustancias naturales están adulterados ilegalmente con fármacos como el sildenafil o tadalafil, que son utilizados para el tratamiento de la disfunción eréctil, así como otro tipo de fármacos sintéticos

activos de las que no se sabe si tienen algún tipo de interacción riesgosa con los componentes de estos productos.^{6,7}

Debido a la falta de cuidado y seguridad en las plantas y hierbas que utilizan para su fabricación, además de que en la mayoría de los casos sus componentes son extraídos con disolventes que causan algún efecto adverso a los consumidores, en algunos casos se encontraron suplementos contaminados por metales como plomo y cadmio^{8,9}

Si bien el tema por si solo trae una amplia gama de opiniones de los usuarios y no usuarios de suplementos; por igual con respecto a su regulación, la seguridad y eficacia, estos productos pueden llevar directamente a algún tipo de problema aunque en su mayoría la percepción pública de estos productos es que son intrínsecamente seguros debido a que se anuncian como totalmente naturales, de esta manera los consumidores lo pueden confundir con la seguridad del producto o el hecho de que se presentan en una forma farmacéutica¹⁰, además de que estos productos no requieren de una receta médica y de esta manera la población ejerce autoconsumo, adquiriendo y utilizando todos los suplementos que cree que van a hacer un bien a su salud.

2.1.3 Regulación de los suplementos alimenticios

En el tema de la regulación, las empresas responsables de fabricar o distribuir suplementos alimenticios no requieren de registro sanitario, únicamente deben contar con el aviso de funcionamiento; es decir no cuentan con estudios que demuestren la eficacia, seguridad y calidad antes de ser comercializados. Su vigilancia se realiza cuando ya están en el mercado.² La FDA (Food and Drug Administration) únicamente solicita estudios previos a la comercialización cuando se trata de un ingrediente nuevo o mezcla de ingredientes nuevos.¹¹

La Ley General de Salud en los artículos 200 bis, 201, 202, 212, 215 y 216 indica los requisitos mínimos que deben cumplir los establecimientos dedicados a la

fabricación de suplementos alimenticios, los cuales van desde los datos de la empresa, naturaleza del producto, fórmula, composición, el etiquetado del mismo, en el cual no podrán incluirse indicaciones con relación a enfermedades, síndromes o síntomas que refieran a datos anatómicos o fisiológicos.¹

En el reglamento de control sanitario de productos y servicios del artículo 168 al 174, se indican los componentes permitidos y los no permitidos en las formulaciones, los tratamientos y control, si deben someterse a procedimientos para eliminar flora microbiana o residuos que puedan dañar la salud, así como la descripción de cada sustancia y si se requiere su monografía. En el apéndice XVII se señala la cantidad máxima de vitaminas y minerales que puede contener un suplemento alimenticio. En la tabla 1 se muestran los ingredientes permitidos y los que no deben contener los suplementos.³

Tabla 1. Ingredientes permitidos y no permitidos en suplementos alimenticios.³

INGREDIENTES PERMITIDOS	INGREDIENTES NO PERMITIDOS
Carbohidratos	Procaína
Proteínas	Efedrina
Aminoácidos	Yohimbina
Ácidos grasos	Germanio
Metabolitos	Hormonas animales o humanas
Plantas	Sustancias farmacológicas reconocidas
Algas	Sustancias que presenten riesgos para la salud
Otros que establezca la secretaría	

Así mismo deben de cumplir con la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, que establece los requisitos mínimos de buenas prácticas de higiene que deben observarse en el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios y sus materias primas a fin de evitar su contaminación a lo largo del proceso.¹²

2.1.4 Relevancia actual de los suplementos alimenticios

La industria de los suplementos alimenticios se ha incrementado en México en los últimos años, colocándolo como el segundo país de América Latina de mayor consumo, este crecimiento se debe a la creencia de los consumidores de que son productos naturales, seguros y sin efectos adversos.^{13, 14}

El aumento de la presencia de los suplementos alimenticios se basa en el hecho de que en la actualidad los efectos sobre la salud humana pueden estar determinados por la relación que existe entre la alimentación y enfermedades. Muchos de estos suplementos tienen determinados objetivos y poblaciones, como son los niños, mujeres embarazadas, deportistas, ancianos, enfermos, entre otros.^{15, 16}

Uno de los tipos de suplementos que han visto mayor crecimiento en el consumo son aquellos que contienen antioxidantes, debido a que se considera que pueden reducir el riesgo de padecer diversas enfermedades crónico-degenerativas y fortalecer el sistema inmunológico.^{17, 18}

Uno de los antioxidantes que se presentan con mayor frecuencia en el mercado es el resveratrol, sobre el cual se abundará a continuación.

2.1.5 Resveratrol: propiedades y usos ^{19, 20,21}

Descripción: Polvo ligeramente amarillo claro, insípido

Soluble en agua

Fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$

Masa molecular 228.24 g/mol

pKa 8.99

Nombre sistemático: 5-[(E)-2-(4-Hidroxifenil) vinil]-1,3- bencenodiol

Punto de fusión de 253-255°C

Coefficiente de reparto LogP 3.14

La estructura molecular de la sustancia se muestra a continuación:

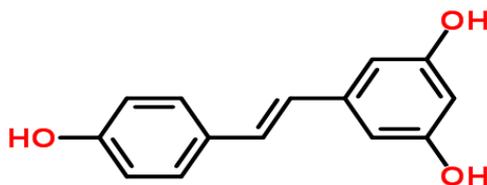


Figura 1. Estructura molecular del resveratrol

En la última década el resveratrol es una de las moléculas naturales que muestra diversas actividades prometedoras dado que, varios autores, sugieren que tiene efectos protectores en varias enfermedades relacionadas con el envejecimiento como: neurodegenerativas, cardiovasculares, también tiene respuesta anti inflamatoria, anti tumoral y anti diabética. Este compuesto se encuentra de manera natural en varias especies de plantas tales como uvas, moras y los cacahuates.^{21, 22, 23, 24, 25}

Numerosos estudios sugieren algunos de los posibles mecanismos de acción del resveratrol, como en el caso de las células afectadas por cáncer, donde el resveratrol puede inducir la apoptosis, que en la mayoría de los casos se lleva a cabo mediante los receptores de muerte celular y la actividad mitocondrial, también expresa actividad anti inflamatoria mediante la inhibición directa de la COX-2, entre otros.^{26, 27, 28}

Así mismo, algunos autores mencionan que estos efectos no siempre se presentan, debido a que dependen directamente de la calidad de los productos que contienen esta sustancia, que varía entre las diferentes marcas disponibles en el mercado, principalmente si el resveratrol está como único componente activo en

la formulación, ya que diversos estudios indican que de esta manera presentan mayor calidad y eficacia en comparación con los que tienen mezclas de resveratrol y otras sustancias activas.^{29, 30}

Debido a la variabilidad que hay en los productos que existen en el mercado que contienen resveratrol, es importante contar con métodos analíticos que permitan cuantificar el contenido de éste, con los que se pueda garantizar que el contenido es lo que indica en su marbete y con esto asegurar su calidad y eficacia.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente los suplementos alimenticios son productos muy utilizados debido a la creencia de los efectos benéficos que tienen, sin los efectos adversos que los medicamentos puedan generar.

Como se sabe, el efecto de una sustancia activa en los organismos depende de la dosis en que ésta se haya administrado, por ello es importante que, como mínimo, estos productos cumplan con el contenido de sustancias o mezclas de sustancias señalados en el marbete con el que se expenden.

Resulta de especial interés el incremento reciente en la venta y consumo de productos que contienen resveratrol, sustancia a la que se le atribuyen efectos protectores en varias enfermedades relacionadas con el envejecimiento y que en el Distrito Federal se expende en productos formulados como cápsulas, tabletas, soluciones, entre otros. A la fecha, en muchos de los casos, estos productos no cuentan con estudios que garanticen la presencia y contenido del o los ingredientes activos a los que se les atribuye una determinada actividad. Por lo anterior, esta investigación se enfocará a conocer si los productos cuyos fabricantes indican que contienen resveratrol y que se venden en el Distrito Federal en realidad lo contienen y en qué cantidad.

4 HIPÓTESIS

Los suplementos adquiridos y cuyos fabricantes establecen que contienen resveratrol contendrán la cantidad indicada en el marbete.

5 OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar el contenido de resveratrol en algunos suplementos alimenticios de venta en el Distrito Federal cuyos fabricantes declaran en su marbete que lo contienen.

Objetivos Particulares:

- Diseñar un método analítico por CLAR útil para cuantificar resveratrol en productos de cuyos fabricantes indican que lo contienen y que se venden en el Distrito Federal.
- Establecer el contenido de resveratrol en los productos estudiados y comparar el contenido con lo que se indica en su marbete.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

Actitud del investigador: Experimental.

Forma de recolección de datos: Prospectivo.

Secuencia temporal de estudio: Transversal.

Tipo de estudio: Descriptivo.

Población de estudio: Productos cuyo marbete indique el contenido de resveratrol

Criterios de inclusión: Productos cuya presentación sea en cápsulas, tabletas, solución oral y que existan en cantidad suficiente para guardar una muestra de retención.

Criterios de exclusión: Productos que tengan una diferente forma farmacéutica a los señalados en el punto anterior y que no existan en cantidad suficiente para guardar una muestra de retención.

Criterios de eliminación: Productos que presenten defectos graves en la apariencia.

6.2 Materiales

- Matraz aforado de 10, 50 y 100 mL.
- Vasos de precipitados de 10, 100 y 500 mL.
- Bureta de 10 mL.
- Soporte universal.
- Pinzas dobles de presión.
- Viales de vidrio con tapa.
- Equipo de filtración para soluciones acuosas.
- Equipo de filtración para soluciones orgánicas.
- Charolas de plástico.
- Picnómetro para líquidos.

6.3 Reactivos

Tabla 2. Listado de reactivos

Reactivo	Marca	Lote
Estándar de resveratrol	Sigma Aldrich	SZBC270XV
Acetato de sodio	J.T. Baker	E33C71
Ácido acético	J.T. Baker	E20C16
Metanol grado HPLC	J.T. Baker	M26C01
Agua desionizada filtrada en equipo Milli-Q	Teisser	

6.4 Equipos e instrumentos

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Varian Prostar, con bomba modelo 24, un inyector modelo 410, un detector UV-Visible modelo 325 LC, acoplado a una computadora Dell modelo DHM con software Galaxie Chromatography Workstation versión 1.8.504.1
- Columna Phenomenex C18 150 mm de largo por 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 µm.
- Equipo de filtración de agua Milli-Q marca Milipore.
- Balanza analítica Marca Ohaus, Explorer Pro, modelo EP214C.
- Micro balanza Mettler Toledo, modelo MT5.
- Espectrofotómetro UV/VIS Varian modelo Cary 50, con monocromador Czerny-Turner de 0.25m, ancho de banda espectral fijo de 1.5mm, lámpara pulsada de xenón de larga duración, óptica recubierta de cuarzo, velocidad máxima de barrido 24000 nm/min, inmune a la luz externa con software WinUV Bio.
- Potenciómetro Cole Parmer.
- Desintegrador de tabletas marca Mayasa.

6.5 Selección de los productos.

Los productos se eligieron con base en una consulta de proveedores de productos que contienen resveratrol y la oferta de los mismos en farmacias y tiendas de autoservicio donde se expenden, se seleccionaron tres productos en los que se cumplieron los siguientes requisitos:

- 1) Su marbete indicó el contenido de resveratrol o extracto de semilla de uva.
- 2) Se comercializan en los establecimientos de forma regular.
- 3) Existían en cantidad suficiente para llevar a cabo la valoración del contenido y permitieron conservar una muestra de retención.

Cumplieron con requisitos mínimos de calidad seleccionados con base en la forma farmacéutica en la que se presentaban.

6.6 Determinación de la calidad de productos comercializados en el Distrito Federal que contienen resveratrol.

Se determinaron algunos atributos de calidad de los productos estudiados con la finalidad de verificar si estos, al menos, cumplían requisitos de gramaje o algunas condiciones mínimas que favorecieran la estabilidad del activo.

Tabla 3. Parámetros a determinar en los productos seleccionados.

Forma farmacéutica	Prueba
Cápsulas	Variación de peso
	Peso promedio
	Contenido promedio de polvo
	% de humedad
	Tiempo de desintegración
	Contenido de resveratrol

Solución oral	Determinación de pH
	Densidad relativa
	Contenido de resveratrol

6.6.1 Cápsulas

6.6.1.1 Variación de peso y peso promedio

Se pesaron con exactitud 30 cápsulas de cada producto en la balanza analítica, se calculó la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

6.6.1.2 Contenido promedio de polvo

Se pesó con exactitud el polvo contenido de 20 cápsulas de cada producto en la balanza analítica, se calculó la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

6.6.1.3 % de humedad

Se colocaron por separado el contenido de 6 cápsulas de cada producto en la termo balanza, por 5 min a 50°C, se calculó el promedio de % de humedad.

6.6.1.4 Tiempo de desintegración

Se colocaron 6 cápsulas de cada producto en el desintegrador a una temperatura de 36°C, se determinó el tiempo de desintegración.

6.6.1.5 Contenido de resveratrol

Se vació el contenido de 10 cápsulas de cada producto y se mezcló, se pesó lo equivalente a 25 mg de resveratrol, se colocó en un matraz aforado de 100 mL y se llevó a volumen con metanol, se tomó una alícuota de 5 mL y se colocó en un

matraz aforado de 50 mL, de esta solución se tomo una alícuota de 6 mL y se llevó a volumen con fase móvil en un matraz de 25 mL. Las muestras analizaron bajo las condiciones:

Fase móvil: 45:55 Solución amortiguadora de acetatos pH 3: Metanol.

Velocidad de flujo: 1.2 mL/min.

Volumen de inyección: 10µL.

Tiempo de corrida: 5 minutos.

Longitud de onda: 305 nm.

Se calculó el contenido real de resveratrol en la muestra por medio de una interpolación lineal contra una curva de estándar, y a partir de ahí el contenido real de resveratrol en los productos.

6.6.2 Solución oral

6.6.2.1 Determinación de pH

Se tomaron 3 muestras cada una de los envases de solución oral, se determinó el pH de cada una de las muestras. Se calculó la media aritmética de pH de la solución oral.

6.6.2.2 Densidad relativa

Se enjuagó el picnómetro para líquidos con agua desionizada y alcohol y se secó perfectamente, se pesó vacío y se registró el peso en gramos hasta la cuarta cifra decimal, posteriormente se pesó con agua y se registró hasta la cuarta cifra decimal, se calculó el peso del agua con la siguiente fórmula:

$$C = B - A$$

Donde:

C= Peso del agua en gramos

B= Peso del picnómetro lleno con agua

A= Peso del picnómetro vacío en gramos

Por último se sustituyó el agua por la muestra con el mismo procedimiento. Se calculó la densidad relativa de la muestra con la siguiente fórmula:

$$DR = \left(\frac{D}{C}\right)$$

Donde:

DR= Densidad relativa

D= Peso de la muestra en gramos

C= Peso del agua en gramos

6.6.2.3 Contenido de resveratrol

Se tomó una muestra de cada lote de la solución oral equivalente a 25 mg de resveratrol, se colocó en un matraz aforado de 100 mL y se llevó a volumen con metanol, se tomó una alícuota de 5 mL de esta solución y se colocó en un matraz aforado de 50 mL, de esta solución se tomó una alícuota de 6 mL y se llevó a volumen con fase móvil en un matraz de 25 mL. Las muestras se analizaron bajo las condiciones:

Fase móvil: 45:55 Solución amortiguadora de acetatos pH 3: Metanol.

Velocidad de flujo: 1.2 mL/min.

Volumen de inyección: 10µL.

Tiempo de corrida: 5 minutos.

Longitud de onda: 305 nm.

Se calculó el contenido real de resveratrol en la muestra por medio de una interpolación lineal contra una curva de estándar, y a partir de ahí el contenido real de resveratrol en los productos.

6.7 Desarrollo del método de análisis.

6.7.1 Determinación de longitud de onda y fase móvil.

De acuerdo con las propiedades físicas y químicas del analito, se buscó la fase móvil adecuada para poder usarla en el equipo de CLAR y de esta manera obtener picos definidos para la cuantificación, las proporciones de fase móvil utilizadas se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 4. Proporciones de la fase móvil para determinar la longitud de onda.

Fase móvil	
% de Metanol	% de solución amortiguadora de acetatos pH 3
75	25
50	50

Se preparó una solución de resveratrol estándar a una concentración de 35 µg/mL y se aforó con la fase móvil de la tabla 4, a esta solución se le realizó un barrido en el espectrofotómetro UV para determinar la longitud de onda máxima del analito.

Posteriormente, se realizaron pruebas en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min y un volumen de inyección de muestra de 10 µL a la longitud de onda determinada con un tiempo de corrida de 20 min para determinar el tiempo de retención de la muestra.

6.7.2 Prueba del método analítico.

Se prepararon por triplicado cinco niveles de concentración de la solución de resveratrol estándar por dilución a partir de un stock. La concentración central era la que representaba el 100% de la muestra procesada para su medición. Se reportó la relación concentración vs respuesta.

Solución stock de resveratrol estándar: Se pesó con exactitud 1 mg de resveratrol estándar y se vació en un matraz volumétrico de 50 mL, se aforó con fase móvil.

Los niveles de concentración de la curva se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 5. Concentraciones de los niveles de la curva de resveratrol estándar.

Concentración teórica ($\mu\text{g/mL}$)
2
4
6
8
10

Estas cantidades se aforaron a un volumen de 10 mL con fase móvil y cada nivel se realizó por triplicado.

Las condiciones del equipo fueron:

Fase móvil: 45:55 solución amortiguadora de acetatos pH 3: Metanol. (Se explica en el numeral 7.2 de este trabajo)

Velocidad de flujo: 1.2 mL/min.

Volumen de inyección: 10 μL .

Tiempo de corrida: 5 min.

Longitud de onda: 305 nm.

Se obtuvo el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b). Los criterios de aceptación que se tomaron para esta prueba fueron: el coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.98$, la precisión determinada por el coeficiente de variación de cada nivel de concentración $\leq 2\%$ y su desviación estándar.

Se realizó el análisis de la relación respuesta vs concentración calculando la F de Fisher para el modelo lineal $y=mx + b$.

Tabla 6. Análisis de varianza para F de Fisher.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada
Regresión	1	SCR	MCR = SCR	$\frac{SCR}{SCER}$
Error de regresión	n-2	SCER	$MCER = \frac{SCER}{n-2}$	

Donde:

SCR = Suma de cuadrados de la regresión.

SCER = Suma de cuadrados del error de la regresión.

SCT = Suma de cuadrados total.

MCR = Media de cuadrados del error.

MCER = Media de cuadrados del error de la regresión.

$$SCR = m^2 \left[\sum X_i - \frac{(\sum X_i)^2}{n} \right] \quad SCER = \sum Y_i^2 - m \sum X_i Y_i - b \sum Y_i$$

$$SCT = \sum Y_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}$$

m = Pendiente de la ecuación lineal.

b = Ordenada al origen de la ecuación lineal.

$\sum X_i$ = Suma de la concentración.

$\sum X_i^2$ = Suma de cuadrados de la concentración.

$\sum Y_i$ = Suma de la propiedad medida.

$\sum Y_i^2$ = Suma de cuadrados de la propiedad medida.

$\sum N$ = Número de determinaciones.

Ho: $F_{calc.} > F_{tab.}$, hay relación lineal significativa entre la propiedad medida y la concentración.

$H_0: F_{\text{calc.}} < F_{\text{tab.}}$, no hay relación lineal significativa entre la propiedad medida y la concentración.

Para la determinación de exactitud se prepararon los niveles de concentración como lo indica la tabla 5, tomando 6 $\mu\text{g/mL}$ como el 100%. Con los resultados obtenidos se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro obtenidos.

Además del análisis de la exactitud calculando t de Student.

El criterio de aceptación fue el siguiente:

Si el valor absoluto de la t_{calc} es mayor o igual al valor de t de tablas, el método de medición es inexacto. $H_0: t_{\text{calc}} \geq t_{\text{tablas}}$, el método es inexacto.

Si el valor absoluto de la t_{calc} es menor al valor de t de tablas, el método de medición es exacto. $H_0: t_{\text{calc}} < t_{\text{tablas}}$, el método es exacto.

Donde:

$$t_{\text{calc}} = \frac{100 - \left(\frac{S}{\bar{x}}\right)}{\left(\frac{S}{\sqrt{n}}\right)}$$

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Selección de los productos.

Existe gran variabilidad entre los diferentes productos que indican el contenido de resveratrol, como en dosis que van desde los 50 hasta 500 mg, el precio que va desde los 45 hasta los 1000 pesos para un uso durante treinta días, así mismo las presentaciones donde se pudo encontrar desde una solución oral hasta una crema. De esta manera las composiciones de los productos cambian significativamente, uno de los componentes que se presenta en cada uno de los productos es el extracto de semilla de uva negra o el *trans*-resveratrol, que es el isómero con la actividad biológica.

Los productos seleccionados fueron aquellos que, de inicio, cumplieron con los requisitos del numeral 5.5 de este trabajo, se encontraron diferentes formas farmacéuticas como cápsulas, tabletas, soluciones orales e inclusive cremas, la elección de los productos se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 7. Productos seleccionados para el estudio.

FORMA FARMACÉUTICA	DOSIS	MARCA	LUGAR DE ADQUISICIÓN
Cápsula	500 mg / Cápsula	GNC	Tiendas GNC
Cápsula	350 mg / Cápsula	Solanum	Tiendas naturistas
Solución Oral	100 mg / 100 mL	Solanum	Farmacias Similares

La selección de los productos se delimitó a dos presentaciones de cápsulas y una solución oral, esto fue debido a su disposición en el mercado ya que era alta, así como su existencia para guardar una muestra de retención que eran dos de los requisitos para su selección.

Tabla 8. Resultados de pruebas a las cápsulas de Resvitalé y Solanum

Cápsula	Peso promedio	Variación de peso (S)	Peso promedio de polvo	% de humedad	Tiempo de desintegración
Resvitalé	0.9641 g	0.0123	0.8101 g	0.1733	7.16 minutos
Solanum	0.4472 g	0.0089	0.3505 g	0.3	6.38 minutos

En la tabla 9 se muestran los resultados de análisis de la solución oral:

Tabla 9. Resultados de pruebas de la solución oral solanum.

	Densidad relativa	Determinación de pH
Solución oral Solanum	1.0681 g/MI	3.103

Para las cápsulas, las pruebas de variación de peso y los pesos promedio son buenas para hallar la uniformidad de dosis si el contenido dentro de la cápsula comprende del 50-100% del peso de las cápsulas, los resultados de las pruebas que se determinaron arrojaron resultados positivos ya que tuvieron una buena uniformidad de contenido, así como la variación de peso que resultó muy baja. En cuanto al porcentaje de humedad se obtuvo un porcentaje muy bajo, y el tiempo de desintegración para ambos productos es bueno dado que no se cuenta con la monografía para determinar su tiempo de desintegración establecido.

La solución oral tuvo una densidad relativa muy cercana a la densidad del agua, lo cual es una buena densidad relativa y un pH ciertamente ácido para una solución oral, aunque posiblemente se deba que sea un pH para aumentar la estabilidad del resveratrol.

Con base en lo anterior, se aseguró que se analizaban productos que, de inicio, cumplieran con atributos mínimos de calidad para ser incluidos en el estudio de contenido de resveratrol.

7.2 Determinación de la fase móvil y longitud de onda.

Debido a que el resveratrol es una molécula ácida con peso molecular menor a 2000, se trabajó cromatografía de fase reversa, con una fase móvil acuosa y un modificador orgánico para evitar una ionización del analito así como favorecer su estabilidad, se trabajó con solución amortiguadora de acetatos pH 3 y metanol, con una columna C18 de 150 x 4.6 mm tamaño de partícula de 5 μ m, que es una columna para desarrollo analítico tradicional de fase reversa.

En el cromatograma de la figura 2 se observa una señal a los 2.40 minutos, correspondiente al resveratrol en la fase móvil solución amortiguadora de acetatos pH 3-, metanol (25:75), a una longitud de onda de 305 nm.

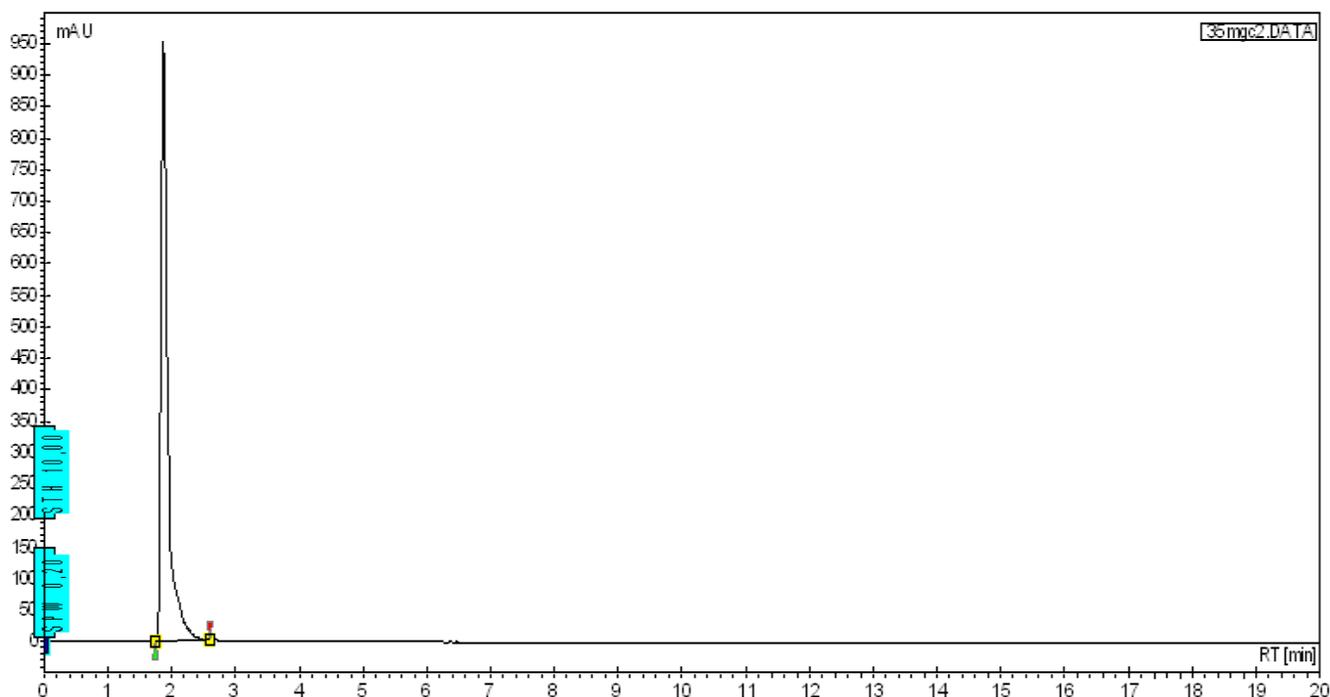


Figura 2. Cromatograma de resveratrol estándar a una concentración de 35 μ g/mL.

La longitud de onda reportada en la literatura donde se presenta el máximo de absorbancia de resveratrol es de 306 nm, se realizó un barrido de 200 a 400 nm

identificando que a la longitud de onda donde se presenta el máximo de absorbancia fue de 305 nm, que es muy cercana a la reportada en la literatura.

Debido a que el resveratrol presentó una señal muy intensa en los primeros minutos de corrida a la concentración de 35 $\mu\text{g/mL}$ se disminuyó la concentración a 7 $\mu\text{g/mL}$ y el tiempo de corrida a 10 minutos y se modificó la fase móvil a una proporción de solución amortiguadora de acetatos pH 3 - metanol (50:50) cuyos resultados se muestran en el cromatograma de la figura 3.

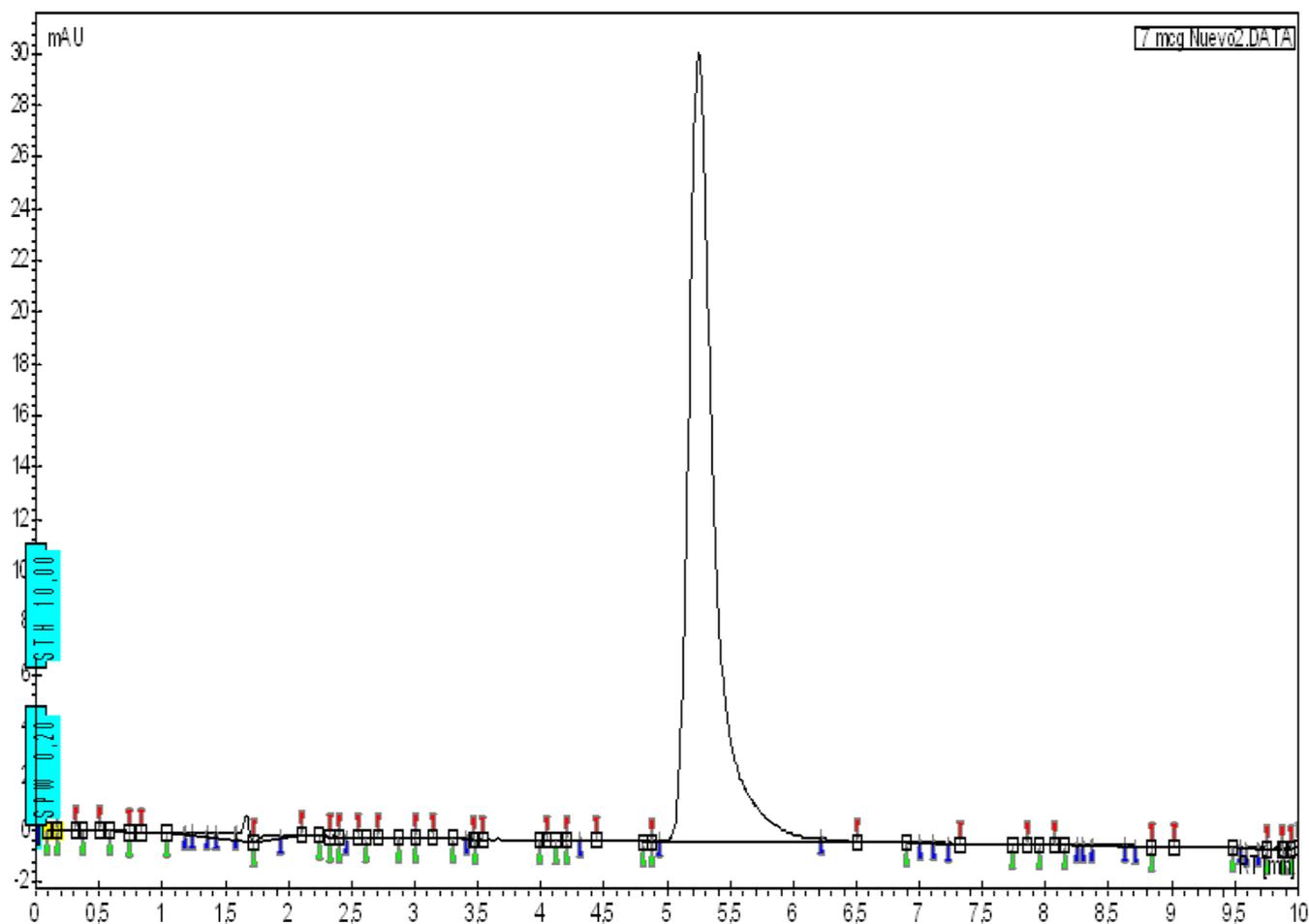


Figura 3. Cromatograma de resveratrol estándar a una concentración de 7 $\mu\text{g/mL}$.

El pico de resveratrol se logró recorrer un poco en el tiempo de retención pero presentó un coleo, posiblemente porque el analito presentó interacciones con algunos silanoles residuales de la columna. Finalmente se decidió modificar la

proporción de la fase móvil a solución amortiguadora de acetatos pH 3- metanol (45:55) con 10 $\mu\text{L/L}$ de un coadyuvante como la dietilamina para reducir las interacciones del analito con la fase estacionaria además de aumentar el flujo a 1.2 mL/min y así disminuir la asimetría del pico, como se muestra en el cromatograma de la figura 4.

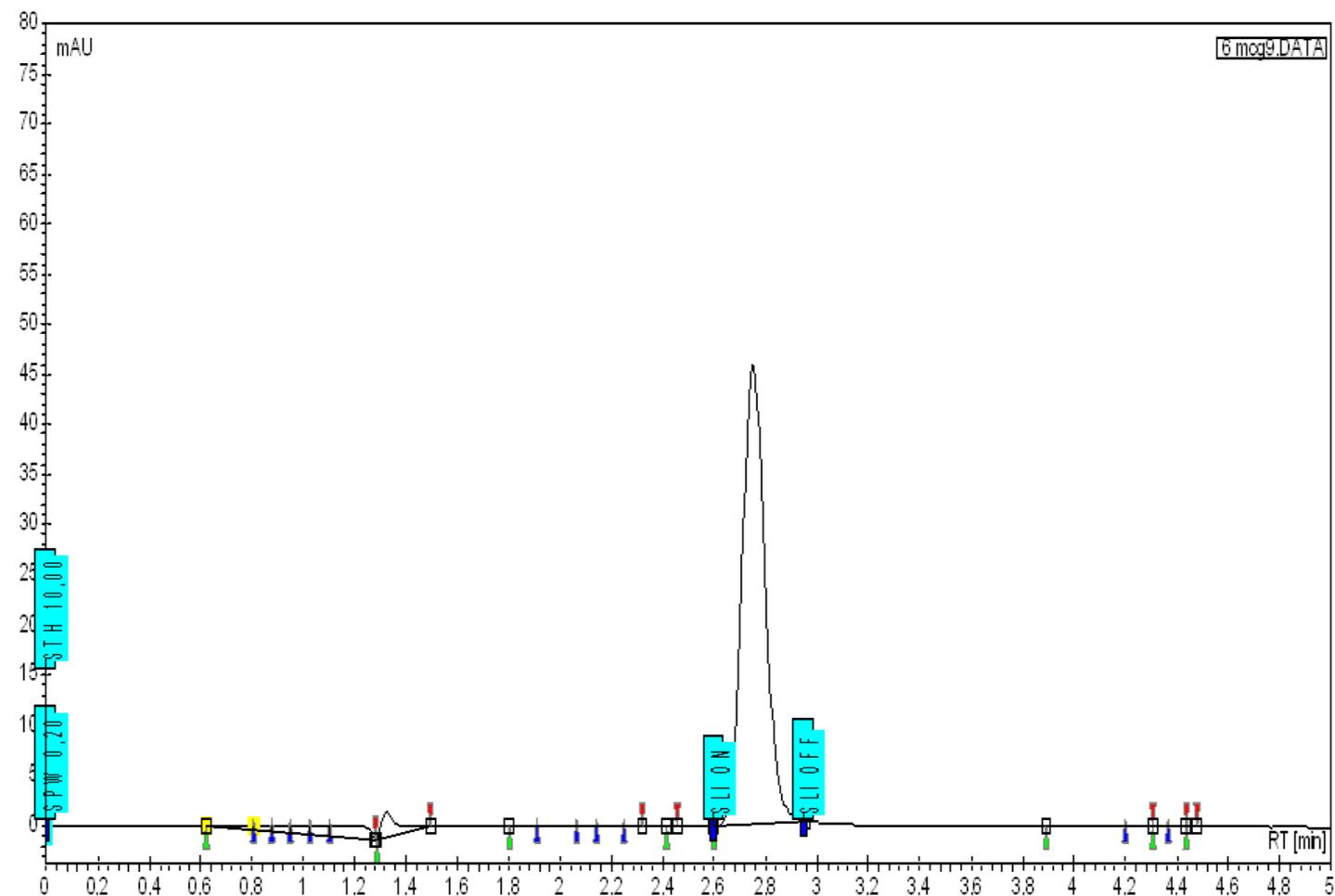


Figura 4. Cromatograma de resveratrol estándar a una concentración de 6 $\mu\text{g/mL}$

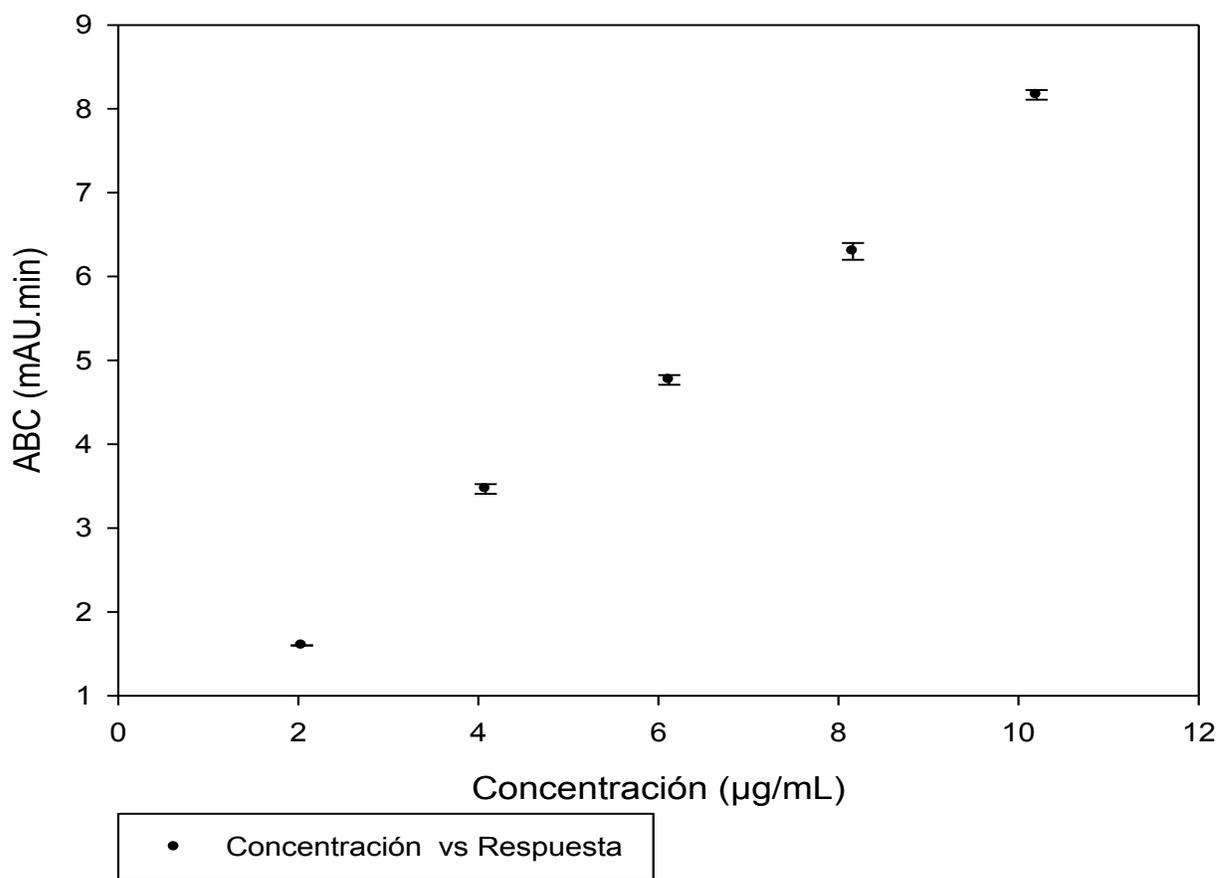
Con estas proporciones de fase móvil así como la adición de la dietilamina se logró obtener una señal más definida y con menos coelo, además de poder disminuir el tiempo de corrida a 5 minutos.

7.3 Prueba del método analítico.

En la gráfica 1, se muestran los datos de la determinación de la proporcionalidad concentración vs respuesta de método analítico, cada punto representa la media \pm la desviación estándar:

Gráfica 1.

Recta de calibración



Coefficiente de correlación r^2 0.9958

Pendiente m: 1.2724

Ordenada al origen b: 0.0639

Tabla 10. Análisis para la varianza de la distribución F de Fisher para la linealidad.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F de tablas
Regresión	1	76.4803	76.4803	3149.6653	4.6672
Error de regresión	13	0.3157	0.0243		
Total	1	76.796			

Se aceptó la hipótesis nula, por lo que se demuestra que hay proporcionalidad en la relación concentración vs respuesta debido a que la F calculada es mayor que la F de tablas.

Adecuabilidad del sistema

- Tiempo de retención de 2.80 ± 0.5 min.
- Factor de capacidad mayor a 1.
- Platos teóricos de la columna mayores a 2000.

Precisión

Los resultados de precisión se muestran en la tabla 11. Los coeficientes de variación para cada nivel están por debajo del criterio establecido de $\leq 2\%$.

Tabla 11. Coeficientes de variación para cada nivel de concentración de la curva.

Concentración teórica de resveratrol (µg/mL)	Promedio de las áreas bajo la curva (mAU.min)	Desviación estándar (S)	Coefficiente de variación (C.V.)
2.04	1.600	5.774E-3	0.3601
4.8	3.4667	5.774E-02	1.6654
6.12	4.7667	1.0E-01	1.2112
8.16	6.300	5.774E-02	1.5873
10.2	8.1667	5.774E-02	0.7070

Exactitud

Se realizó con tres niveles de concentración de las muestras calculando el % de recobro de cada una, el promedio de % de recobro por nivel y el coeficiente de variación de cada nivel, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 12. Promedios y coeficiente de variación de % de recobro para cada nivel de la curva

Concentración (µg/mL)	Promedio de % de recobro	C.V. del % de recobro	t calculada	t de tablas
2.04	98.8235	0.2566	3.9307	1.7613
6.12	98.0512	1.2286	1.8987	
8.16	97.5470	1.6049	2.3900	

Además se determinó el cálculo de la exactitud usando el estadígrafo *t* de Student, con la ecuación y las hipótesis planteadas en el numeral 6.7.2 de este trabajo.

t de Student de tablas al 95% confianza con n-1 grados de libertad= 1.7613

Por lo tanto se acepta la hipótesis nula, y se confirma que el método de medición es exacto para tres niveles de concentración.

7.4 Determinación de la calidad de productos comercializados en el Distrito Federal que contienen resveratrol.

En el cromatograma de la figura 5 se observa una señal a los 2.80 minutos, correspondiente al resveratrol de la cápsula Resvitalé.

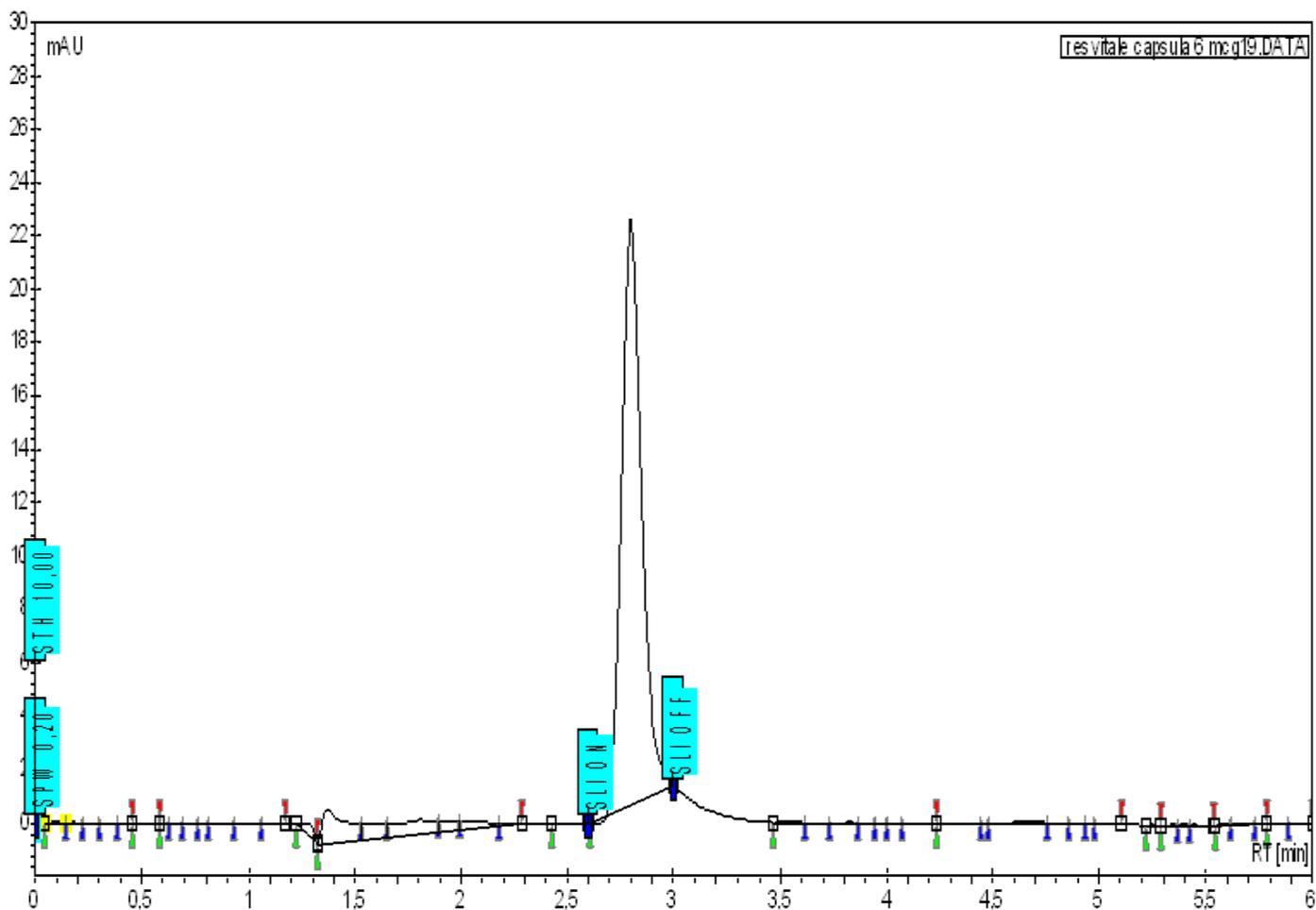


Figura 5. Cromatograma de cápsula con marca Resvitalé a una concentración de 6 µg/mL.

En el cromatograma de la figura anterior se puede observar un pico correspondiente al resveratrol, aunque en este pico se puede observar que existe

interferencia de algún componente de la formulación posiblemente, presenta una buena señal a concentraciones bajas, aunque con un coleo en el pico.

Este producto si contiene resveratrol aunque la señal del pico es más baja que la señal obtenida con el estándar de resveratrol. El método es bueno para detectar el resveratrol de la cápsula de Resvitalo dentro del intervalo de concentraciones establecido.

En el cromatograma de la figura 6 se observa un pico a los 2.80 minutos correspondiente al resveratrol en la cápsula de resveratrol Solanum.

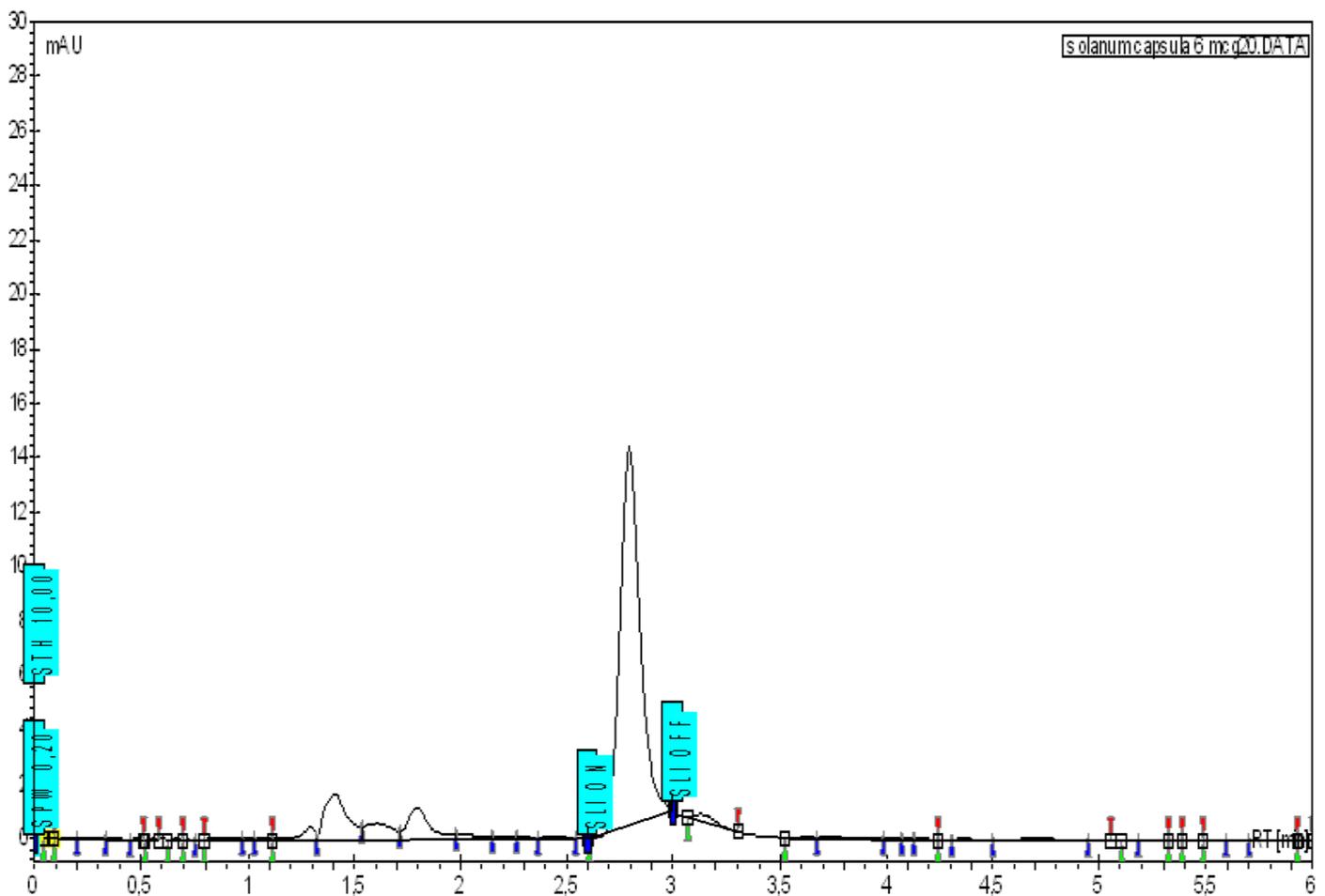


Figura 6. Cromatograma de cápsula con marca Solanum a una concentración de 6 $\mu\text{g/mL}$.

En el cromatograma de la figura 6, a diferencia del cromatograma de la figura 5, se puede observar que existe mayor interferencia de los componentes de la formulación ya que existe una señal aproximadamente al minuto 1.4, aunque no interfieren con la señal correspondiente al resveratrol que presenta algunas señales encimadas casi al final del pico correspondiente y el coleo, también la altura del pico es mucho menor a la esperada.

En el cromatograma de la figura 7 no se observa ningún pico de la solución oral de Solanum.

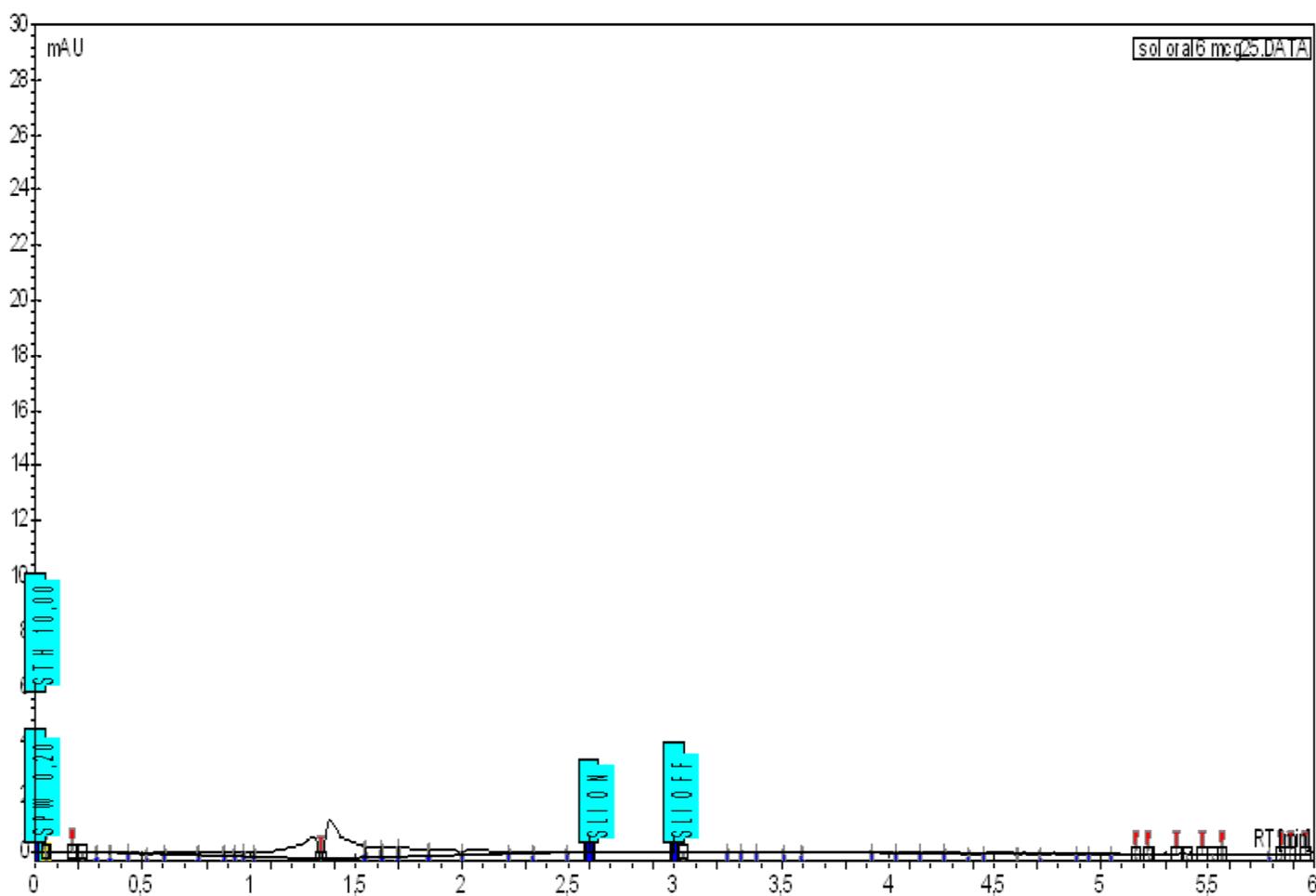


Figura 7. Cromatograma de solución oral con marca Solanum a una concentración de 6 µg/mL.

En el cromatograma de la figura 7 no se observa ninguna señal, lo cual nos indica que si es que contiene resveratrol, no se puede observar en el intervalo establecido para el método desarrollado en este trabajo, se analizaron diferentes lotes de la solución oral y en ninguno de ellos se detectó algún tipo de señal correspondiente al resveratrol.

A pesar de que las concentraciones teóricas en los tres productos fueron las mismas, la altura del pico no fue la esperada, esto podría indicar que el contenido real de resveratrol en la muestra es menor al teórico, y en el caso de la solución oral no se detectó ninguna señal.

El cálculo del contenido real de resveratrol en los productos se realizó por medio de una interpolación lineal, donde únicamente las cápsulas de Resvitale fueron el único producto en donde se obtuvo una señal que cumpliera con el intervalo de concentraciones establecido en el método, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 13. Resultados de contenido de resveratrol en la cápsulas Resvitale.

	Muestra inyectada	En 26.6 mg de polvo	Por cápsula	%
Contenido teórico	6 µg/mL	25 mg	773 mg	100
Contenido real	2.027 µg/mL	8.4458 mg	255.93 mg	33.11

Para las cápsulas de Solanum no se logró realizar el cálculo, debido a que la respuesta no era interpolable en el intervalo del método establecido con exactitud y precisión.

Con la solución oral no se logró realizar el cálculo debido que no se detectó señal alguna en el intervalo establecido para el método.

Siendo que el contenido de resveratrol en los productos no es el indicado en su marbete, estos productos no cumplen con la calidad esperada y por lo tanto la hipótesis se rechaza. Es posible que en este último resultado influyera la poca estabilidad del resveratrol ya que es extremadamente oxidable y altamente fotosensible con un tiempo de vida media de 30-45 min.³¹

En 2012 se realizó un estudio con 14 productos que indicaban el contenido de resveratrol en su marbete, los resultados obtenidos fueron: cinco productos estaban dentro del rango de 95-105% de lo que indicaba su marbete, de estos solo tres declaraban ante la FDA sus buenas prácticas de fabricación y únicamente uno contaba con resveratrol estandarizado, cuatro estaban en el rango de 83-111% y cinco en el rango de 8-64% de lo que indicaba su marbete.³² Nuestros resultados confirman las variaciones de calidad, y son relevantes porque es la primera ocasión que se realiza un estudio de este tipo en México.

8 CONCLUSIÓN

En los productos que indican en su marbete el contenido de resveratrol se logró determinar la cantidad real contenida en uno de ellos, mediante el desarrollo de un método analítico que es específico, lineal, preciso y exacto.

Los productos no cumplen con la calidad mínima requerida, en lo que concierne a contenido de resveratrol, se venden con supuestas garantías de calidad, no están controlados como medicamentos y no cuentan con la garantía de tener una calidad suficiente para no presentar un riesgo.

9 REFERENCIAS

1. Ley General de Salud. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Nueva ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 1984. Texto Vigente: Última reforma publicada DOF 02-04-2014.
2. M.M. Martino, R. Martino, P.A. Bonnet. Nutritional Supplements. Biomedical NRM Group. 2013; (17): 539-68.
3. COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios [Internet]. México: COFEPRIS; [citado 07 Abril 2014]. Suplementos alimenticios [Aprox. 9 pantallas]. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/Paginas/Suplementos%20Alimenticios/Suplementos-Alimenticios.aspx>
4. S. Gorgog. Drug safety, drug quality, drug analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007; (48): 247-253.
5. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.
6. F. Damiano, C. Silva, A. Gregori. Analysis of illicit dietary supplements sold in the Italian market: Identification of a sildenafil thioderivate as adulterant using UPLC-TOF/MS and GC/MS. Science and Justice. 2014; (54): 228-37.
7. V. Cianchino, G. Acosta, C. Ortega. Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. Food Chemistry. 2008; (108): 1075-81.

8. A. Filipiak-Szok, M. Kurzawa, E. Szlyk. Determination of toxic metals by ICP-MP, in Asiatic and European medicinal plants and dietary supplements. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2014.
9. A. Karioti, E. Giocaliere, C. Guccione. Combined GPLC-DAD-MS, HPLC-MS and NMR spectroscopy for quality control of plant extracts: The case of a commercial blend sold as dietary supplement. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013.
10. C. Hilmas, D. Fabricant. Biomarkers of toxicity for dietary ingredients contained in dietary supplements. *Overview of Regulation of Dietary Supplements in the USA*. Chapter 35.
11. FDA: Food and Drug Administration [Internet]. E.U.A.: FDA; [citado 07 Abril 2014]. Dietary Supplements [aprox. 5 pantallas]. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/DietarySupplements/default.htm>
12. Reglamento de control sanitario de productos y servicios. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 09 de agosto de 1999. Última reforma publicada DOF 28 de noviembre 2012.
13. Secretaría de salud. Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.
14. L. Garcia, J. Leyva, M. Marini. Content and daily intake of copper, zinc, lead, cadmium, and mercury from dietary supplements in Mexico. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; (45): 1599-605.

15. K.P. Baran. Encyclopedia of Toxicology. 3a Ed. Elsevier. 2014; 128-133.
16. P.W. Yong, L.B. Tan, Y.H. Loh, Consumption of dietary health supplements among hospitalized patients at acute tertiary Hospital. PharmaNutriton. 2014; (2): 135-140.
17. D. Yoshihara, N. Fujiwara, K. Suzuki. Antioxidants: Benefits and risks for long-term health. Maturitas. 2010; (67): 103-7.
18. C. De Ceglie, C. D. Calvano. MALDI-TOF MS for quality control of high protein content sport supplements. Food Chemistry. 2015; (176): 396-402.
19. C. Moreira, M. Silva, S. Santos. Resveratrol effects of rat liver and brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress in vitro: Investigation of the role of gender. Food Chemical Toxicology. 2013; (51): 18-26.
20. The Merck Index. 11^a. Ed. USA: Merck & CO., Inc., 1996.
21. J. Barreiro, S. Colombo, E. Cantos. Is there market for functional wines? Consumer preferences and willingness to pay for resveratrol-enriched red wine. Food Quality and Preference. (2008); (19): 360-71.
22. W. Chun Fu, Y. Jing Yu, W. Fang, W. Xiao Xiao. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. Chinese Journal of Natural Medicines. 2013; (11): 1-15.
23. L. Xiang, L. Xiao, Y. Wang, H. Li, Z. Huang, X. He. Health benefits of wine: Don't expect resveratrol too much. Food Chemistry. 2014; (156): 258-63.

- 24.I. Sadawska, G. Bartosz. Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity. *BioMed Research International*. Volume 2014; Article ID 404680.
- 25.M. Jasinski, L. Jasinska, M. Ogradowczyk. Resveratrol in prostate diseases – a short review. *Central European Journal Of Urology*. 2013: 144-9.
- 26.N. Ratola, J. Luis, A. Alves. Analysis and Quantification of trans-Resveratrol in wines from Alentejo Region (Portugal). *Food Technology and Biotechnology*. 2004; (42): 125-30.
27. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada RY. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. *Anti cancer Sci* 2004; 24: 2783-840.
- 28.Fang Y, DeMarco VG, Nicholl MB. Resveratrol enhances radiation sensitivity in prostate cancer by inhibiting cell proliferation and promoting cell senescence and apoptosis. *Cancer Sci*. 2011; 103: 1090-8.
- 29.Quang X, Liang Y. Resveratrol role in cardiovascular and metabolic health and potential mechanisms of action. *Nutrition research*. 2012; (32): 648-58.
- 30.C. Moreira. Resveratrol affects differently rat liver and brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress in vitro: Investigation of the role gender. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; (53): 18-26.

31. Xiao P., Yuan L., Jie-Xin W. Resveratrol nanodispersion with high stability and dissolution rate. *LWT*. 2013; (50). 622-628.
32. Damiano R, Alessandra G, Renato B, et al. *Trans*- Resveratrol in Nutraceuticals: Issues in Retail Quality and effectiveness. *Open Access Molecules*. 2012; (17).